

**Untersuchungen
zur DNA-mismatch-Reparatur
in Escherichia coli: Die Korrektur
von Fehlpaarungen, die aus der spontanen
hydrolytischen Desaminierung
von 5-Methyl-Cytosinresten resultieren**

Roland Zell

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554823_0119

**Untersuchungen zur DNA-*mismatch*-Reparatur in
Escherichia coli: Die Korrektur von Fehlpaarungen,
die aus der spontanen hydrolytischen Desaminierung von
5-Methyl-Cytosinresten resultieren**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Roland Zell
aus Leverkusen

München
März 1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Bandlow
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Schmieger
- Sondergutachter: Prof. Dr. G. Gerisch

Tag der mündlichen Prüfung: 27. 7. 1988

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstr. 15, Tel. 288663

Diese Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München unter Anleitung von Dr. Hans-Joachim Fritz angefertigt und durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft *Schwerpunkt Gentechnologie* gefördert.

Herrn Professor Bandlow danke ich für die Betreuung und das Interesse am Fortgang der Arbeit. Ich danke Herrn Professor Gerisch, in dessen Abteilung diese Arbeit durchgeführt wurde.

Mein besonderer Dank gilt U. Schimanko und J. Wippler für die Synthese von Oligonukleotiden und H. Kolmar, J. Graff, E. Ferrando und N. Gerwin für ihre Hilfe bei einigen Mutagenesen und Transfektionsexperimenten.

Ich danke ferner allen Kollegen, die durch gute Zusammenarbeit, Rat und Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Verwendete Abkürzungen und Symbole

A	Adenin
AGB	Agaraosegelpuffer
2-AP	2-Aminopurin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
5meC	5-Methylcytosin
Ci	Curie
<i>dam</i>	DNA adenine methylation; Genlocus, codiert für eine Adenin-Methyltransferase
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
ddATP	2',3'-Didesoxyadenosin-5'-triphosphat
ddCTP	2',3'-Didesoxycytidin-5'-triphosphat
ddGTP	2',3'-Didesoxyguanosin-5'-triphosphat
ddTTP	2',3'-Didesoxythymidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
<i>dcm</i>	DNA cytosine methylation; Genlocus, codiert für eine Cytosin-Methyltransferase; alternatives Gensymbol: <i>mec</i>
DOC-Lösung	Deoxycholat-Lösung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>dut</i>	Genlocus, codiert für die Desoxyuridintriphosphatase (dUTPase); alternative Gensymbole: <i>dnaS</i> , <i>sof</i>
dYT	<i>double YT (Yeast/Tryptone)-Medium</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
G	Guanin
O ⁶ meG	O ⁶ -Methylguanin
gdDNA	<i>gapped duplex-DNA</i>
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> , Hochdruckflüssigkeitschromatographie

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
l	Liter
<i>lacI</i>	Genlocus, codiert für das Repressorprotein des <i>Lactose</i> -Operons
<i>lacZ</i>	Genlocus, codiert für die β -D-Galactosidase des <i>Lactose</i> -Operons
M	molar
m	milli-
μ	mikro-
MHT	<i>mix-heat-transfect</i> ; Kurzprotokoll für Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese
<i>m. o. i.</i>	<i>multiplicity of infection</i>
<i>muthL,S</i>	Genloci; Mutationen, die zu einem <i>Murator</i> phänotyp führen; gekennzeichnet durch hohe Raten von <i>frameshift</i> -Mutationen und Substitutionsmutationen
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
ndDNA	<i>nicked duplex</i> -DNA
O.D.	optische Dichte
p	pico-
PB	<i>Penassay Broth</i> , Flüssigmedium
PEG	Polyethylenglykol
<i>pfu</i>	<i>plaque forming unit</i>
Pu	Purin
Py	Pyrimidin
RF-DNA	Replikative Form-DNA des Phagen M13 (doppelsträngig)
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>ssb</i>	<i>single strand binding</i> ; Genlocus, codiert für ein Einzelstrang-bindendes Protein
ssc-Puffer	<i>salt/sodium citrate</i> -Puffer
ssDNA	<i>single strand</i> DNA, Einzelstrang-DNA
Su	Suppressor-Phänotyp; Suppression von <i>nonsense</i> -Mutationen
T	Thymin
TBE-Puffer	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris/EDTA-Puffer
TES-Puffer	Tris/EDTA/Salz-Puffer
TM-Puffer	Tris/Magnesiumchlorid-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil
<i>ung</i>	Genlocus, codiert für die <i>Uracil</i> -DNA- <i>N</i> -Glycosidase

UV	ultraviolett
<i>uvrD</i>	Genlocus; codiert für die Helicase II; Reparatur von UV-Schäden an der DNA; alternative Gensymbole: <i>dar-2</i> , <i>mutU</i> , <i>pde</i> , <i>rad</i> , <i>recL</i> , <i>uvrE</i> , <i>uvr502</i>
VSP	<i>very short patch</i>
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight/volume</i>
x-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	3
1.1. Allgemeine Einführung: Die Notwendigkeit von DNA-Reparatur	3
1.2. Die methylierungsinstruierte DNA- <i>mismatch</i> -Reparatur	4
1.3. Die "very short patch"-Reparatur (VSP): Ein zweites DNA- <i>mismatch</i> -Reparatur-System in <i>E. coli</i>	6
2. Experimenteller Teil	9
2.1. Medien	9
2.2. Puffer und Lösungen	9
2.3. Elektrophoresetechniken	11
2.3.1. Agarosegelelektrophorese	11
2.3.2. Polyacrylamidgelelektrophorese	11
2.4. DNA-Präparationstechniken	11
2.4.1. Großpräparation von Einzelstrang-DNA	11
2.4.2. Minipräparation von Einzelstrang-DNA zur DNA-Sequenzanalyse	12
2.4.3. RF-DNA-Großpräparation	12
2.4.4. Plasmid-DNA- und RF-DNA-Minipräparation	13
2.4.5. Elektroelution aus hochschmelzenden Agarosegelen	13
2.4.6. Extraktion aus niedrigschmelzenden Agarosegelen	13
2.4.7. Extraktion von Oligonukleotiden aus Polyacrylamidgelen	13
2.4.8. Reinigung von großen DNA-Fragmenten und " <u>nicked duplex</u> " DNA durch Sedimentationszentrifugation in Sucrosegadien	14
2.5. DNA-Sequenzierung	14
2.6. Oligonukleotidsynthese und Aufarbeitung der synthetischen Oligonukleotide	15
2.7. Oligonukleotid-dirigierte Mutationskonstruktion nach der "gapped duplex"-DNA Methode	16
2.8. Transfektion und Transformation von <i>E. coli</i> -Stämmen	17
2.9. Bakterien	19
2.9.1. Stammkonstruktionen	19
2.10. Phagen	19
2.10.1. Phagenkonstruktionen	21
3. Ergebnisse und Diskussion	23
3.1. Das experimentelle System	23
3.2. Direkter Nachweis der VSP-Reparatur	25
3.3. Die Verwandtschaft der VSP-Reparatur zur methylierungsabhängigen Reparatur	29

3.4. Die Konkurrenz zwischen den verschiedenen DNA- <i>mismatch</i> -Reparatursystemen	29
3.5. Experimente zur Substraterkennung	34
3.6. Untersuchungen zur Traktlänge der VSP-Reparatur	40
3.6.1 <i>Doppelmarker-Experimente zur Untersuchung von DNA-Synthese-Traktlängen</i>	42
3.6.2. <i>Nachweis entkoppelter Reparatur durch das VSP-System</i>	44
3.6.3. <i>Experimente zur Traktlängenverteilung</i>	47
3.6.4. <i>Nachweis großer Traktlängen, die durch das VSP-Reparatursystem initiiert werden</i>	51
3.7. Untersuchungen zur Substratspezifität der VSP-Reparatur	54
3.8. Die biologische Relevanz der VSP-Reparatur in <i>E. coli</i>	60
3.8.1. <i>Betrachtungen zur molekularen Ursache der <u>Transitions</u>hotspots in <u>dcm</u>-Sequenzen</i>	61
3.8.2. <i><u>Frameshift-hotspots</u> im <u>lacI</u>-Gen und VSP-Reparatur</i>	65
3.8.3. <i>Abschließende Betrachtungen: Die Rolle der VSP-Reparatur bei der genetischen Rekombination und Möglichkeiten zur praktischen Anwendung der VSP-Reparatur</i>	66
4. Zusammenfassung	67
5. Literaturverzeichnis	69

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Einführung: Die Notwendigkeit von DNA-Reparatur

Als Träger der Erbinformation ist die Desoxyribonukleinsäure (DNA) an zwei wichtigen zellulären Prozessen beteiligt, der Replikation und der Transkription. Eine Voraussetzung für ihre einwandfreie Funktion ist der Erhalt der Information über lange Zeiträume.

Die Komplexität der DNA - allein ein so einfacher Organismus wie *E. coli* hat ein Genom von circa 4.7×10^6 Basenpaaren (KOHARA *et al.*, 1987) und dieses besteht aus mehr als 300 Millionen Atomen - macht sie zu einem sehr anfälligen Molekül, zumal sie - wie andere organische Moleküle auch - eine metastabile Verbindung ist. Unter geeigneten Reaktionsbedingungen kann sie von Molekülen ihrer Umgebung chemisch verändert werden. Modifikationsreaktionen erfüllen unter zellulärer Kontrolle gewisse Funktionen (z. B. das Modifikations-/Restriktionssystem vieler Bakterien, Genregulation in höheren Organismen; siehe dazu die Reviewartikel von MARINUS, 1987, und DOERFLER, 1983), können aber zu Mutationen führen, wenn sie den Informationsgehalt der DNA ändern oder zerstören. Zahlreiche modifizierende Agenzien und Faktoren sind bekannt, u. a. energiereiche elektromagnetische Strahlung (UV-Licht, Röntgenstrahlung), ionisierende Strahlung, alkylierende und desaminierende Substanzen wie Methyl-Methan-Sulfonat, N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin, salpetrige Säure und Hydroxylamin. DNA-Modifikationen können Nukleotid-Fehllinkorporationen bei der Replikation oder Transkription fördern oder zum Abbruch dieser Prozesse führen, wenn sie die Polymerasen inhibieren.

Ein anderer Typ von Fehlern sind Nukleotid-Fehllinkorporationen bei der Replikation, die durch DNA-Basenfehlpaarungen aufgrund der begrenzten DNA-Polymerase III-Selektivität entstehen und beim sog. Editieren ("*proofreading*") nicht sofort durch die ϵ -Untereinheit der DNA-Polymerase III entfernt werden. Solche Mutationen lassen sich induzieren durch Basenanaloga, also Substanzen, die den vier natürlichen Basen der DNA strukturell ähnlich sind (z. B. 2-Aminopurin, 5-Brom-Uracil) und daher bei der Replikation irrtümlich in die wachsende DNA-Kette inkorporiert werden. Kurze Insertionen und Deletionen von nur wenigen oder aber einigen Hundert Nukleotiden sind ebenfalls eine inhärente In-Akkuratesse der DNA-Polymerase III. Als Ursache dieser Mutationen wird das sog. "*primer/template slippage*" (STREISINGER *et al.*, 1966; ALBERTINI *et al.*, 1982) diskutiert. Diese Klasse von Mutationen tritt phänotypisch erst nach der nächsten Zellteilung in Erscheinung.

Da Mutationen nicht nur Auswirkungen auf den betroffenen Organismus haben, sondern auch an alle potentiell nachfolgenden Generationen weitergegeben werden können, erscheint es einleuchtend, daß sich Mechanismen evolviert haben, die den

Informationsgehalt sichern sollen. Die Redundanz der genetischen Information aufgrund der Doppelhelixstruktur der DNA und der Basenkomplementaritätsregel ist dafür eine elementare Voraussetzung. In *E. coli* wurden mehrere DNA-Reparatursysteme gefunden und beschrieben (für einen Überblick siehe FRIEDBERG, 1985).

So gibt es Reparatursysteme, die Schäden durch UV-Bestrahlung, Desaminierung, Alkylierung, Depurinisierung und Depyrimidinisierung erkennen und korrigieren. Oft gibt es für einen Schadenstyp sogar mehrere, alternative Mechanismen (z. B. Photoreaktivierung, Rekombinationsreparatur, Basenexcision oder Nukleotidexcision), die entweder konstitutiv arbeiten oder induziert werden müssen. Für Fehler, die bei der Replikation entstehen, hat sich in *E. coli* ein spezifisches, postreplikatives Reparatursystem evolviert, die sog. "methylierungsinstruierte DNA-*mismatch*-Reparatur".

1.2. Die methylierungsinstruierte DNA-*mismatch*-Reparatur

Das Konzept der *mismatch*-Reparatur (für einen Überblick siehe die Reviews von CLAVERYS and LACKS, 1986, RADMAN and WAGNER, 1986, und MODRICH, 1987) entwickelte sich in den 60er Jahren, als man bei der genetischen Rekombination von Pilzen für die Trennung sehr eng benachbarter Marker bedeutend mehr Rekombinanten beobachtete als aus der physikalischen Distanz zu erwarten war ("hohe negative Interferenz"). Zur Erklärung solcher Markereffekte, aber auch von "*map expansion*" und Co-Konversionen bei Mehrfaktorkreuzungen wurde *mismatch*-Reparatur im Heteroduplex-Stadium der Rekombination postuliert (HOLLIDAY, 1964).

Indirekte Evidenz für *mismatch*-Reparatur erhielt man aus markerspezifischen Unterschieden in den Effizienzen bei der Transformation von *Streptococcus pneumoniae*. Dieser Organismus gehört zu den Gram-positiven Bakterien und nimmt bei der Transformation nur einen DNA-Einzelstrang auf. Dieser bildet mit der Rezipienten-DNA ein Heteroduplex-Molekül, das in Wildtyp-Stämmen einer *mismatch*-Reparatur gegen die aufgenommene, einzelsträngige DNA unterworfen ist. Effiziente Reparatur definierter Fehlpaarungen führt zu niedrigen Markerausbeuten, wenig effiziente Reparatur zu hoher Ausbeute. Sog. "*hex*"-Stämme (für "*heteroduplex excision*") sind Reparatur-defizient und zeigen diese Markereffekte nicht mehr; solche Stämme lassen sich für alle Marker gleich gut transformieren. Die Untersuchungen des *hex*-Systems in *S. pneumoniae* führten zu der Hypothese von TIRABY and FOX, 1973, daß die Funktion der *mismatch*-Reparatur die Vermeidung von Mutationen sei.

Direkte Hinweise auf DNA-*mismatch*-Reparatur erhielt man erst durch Transfektion von *E. coli* mit *in vitro* konstruierten λ -Heteroduplex-Molekülen unter Bedingungen, in denen die Rekombination der Phagen und gegebenenfalls deren

Replikation blockiert waren (WHITE and FOX, 1974; WILDENBERG and MESELSON, 1975). Die Analyse der Nachkommen einzelner Heteroduplex-DNA-Moleküle aus diesen Experimenten ergab, daß markerabhängig neue Heteroduplex-DNAs entstanden mit einem rekombinanten DNA-Strang, der aus der Reparatur resultierte, und einem DNA-Strang, der dem parentalen Genotyp entsprach. Diese Ergebnisse konnten am besten durch DNA-*mismatch*-Reparatur erklärt werden. In weiteren Studien entwickelten WAGNER and MESELSON, 1976, die Hypothese von TIRABY and FOX, 1973, weiter: die *mismatch*-Reparatur eliminiert Fehlpaarungen, die bei der Replikation entstehen; die fehlerhafte DNA wird durch Nukleotidexcision abgebaut und anschließend durch DNA-Neusynthese ersetzt; die durchschnittliche Traktlänge beträgt 3000 Nukleotide und mehr (daher auch als "*long patch*"-Reparatur bezeichnet); die transiente Untermethylierung an den GATC-Sequenzen im neusynthetisierten Tochterstrang (LYONS and SCHENDEL, 1974; MARINUS, 1976) erlaubt die Unterscheidung zwischen parentaler DNA und der fehlerhaften DNA. Die Reparatur findet also zugunsten des methylierten DNA-Stranges statt, weshalb sie dieses Reparatursystem als "methylierungsinstruierte" oder "methylierungsabhängige" DNA-*mismatch*-Reparatur bezeichneten.

Diese Hypothese wurde später durch Experimente von PUKKILA *et al.*, 1983, bestätigt, indem gezeigt wurde, daß Fehlpaarungen methylierungsabhängig, aber mit unterschiedlichen Effizienzen repariert wurden. Die Natur der untersuchten Fehlpaarungen war nicht bekannt. Erst KRAMER *et al.*, 1984 a, und DOHET *et al.*, 1985, verwendeten Heteroduplex-DNA-Moleküle, mit definierten DNA-Base/Base-Fehlpaarungen und kontrollierten *dam*-Methylierungszuständen. Ihre vorläufige Charakterisierung dieses Reparatursystems ergab, daß es wesentlich zur hohen Replikationsgenauigkeit in *E. coli* beiträgt, indem es postreplikativ bestimmte Fehlpaarungen zwischen natürlichen DNA-Basen beseitigt (T/G-, C/A-, G/G-, A/A- und einige T/T-Fehlpaarungen), während andere Fehlpaarungen (C/T-, T/C-, C/C-, eine T/T-, G/A- und A/G-Fehlpaarungen) nicht prozessiert werden. Basen-Fehlpaarungen können als Folge von Nukleotid-Misinkorporationen entstehen, die dem Editieren der DNA-Polymerase III-Untereinheit ϵ entgangen sind. Kurze Deletionen/Insertionen von ein oder zwei Nukleotiden, die wahrscheinlich eine Folge des "*primer/template slippage*" der DNA-Polymerase III sind und zu "*frameshift*"-Mutationen führen, lassen sich als "Fehlpaarungen" auffassen, denn sie bewirken Helixanomalien, die Substrate der methylierungsabhängigen Reparatur sind (B. KRAMER, 1986; DOHET *et al.*, 1986). Auch induzierte Fehlpaarungen, an denen unnatürliche Basen beteiligt sind (z. B. 2-Aminopurin/Cytosin, 5-Bromuracil/Guanin, N⁴-Hydroxycytosin/Guanin; "anomale DNA-Base/Base-Fehlpaarungen") (siehe dazu CLAVERYS and LACKS, 1986; aber auch RYDBERG, 1977, 1978, und SLEDZIEWSKA-GOJSKA and JANION, 1982) können korrigiert werden. Fehlpaarungen, die bei der genetischen

Rekombination entstehen, oder G/T-Fehlpaarungen nach Inkorporation von O₆meG gegenüber Thyminresten und anschließender De-Methylierung (zum Mechanismus siehe EADIE *et al.*, 1984) und anomale Fehlpaarungen, die durch modifizierende Agenzien an ruhender DNA entstehen (JANION, 1982), können wegen der *dam*-Methylierung der beiden DNA-Stränge nicht methylierungsabhängig repariert werden.

Eine Reihe von Proteinfaktoren sind an diesem Reparaturprozeß beteiligt (LU *et al.*, 1984):

Das MutS-Protein erkennt Fehlpaarungen, bindet daran und leitet die *mismatch*-Reparatur ein; da es nicht alle Fehlpaarungen gleich gut erkennt oder bindet (SU and MODRICH, 1986), gibt es unterschiedliche Effizienzen in der Reparatur der verschiedenen Fehlpaarungen (KRAMER *et al.*, 1984 a; DOHET *et al.*, 1985).

Das MutH-Protein ist eine GATC-spezifische Endonuklease: es erkennt hemimethylierte GATC-Sequenzen und schneidet den unmethylierten Strang 5' vom Guanin (WELSH *et al.*, 1987).

Die Funktion des MutL-Proteins ist unbekannt.

Das *uvrD*-Genprodukt (*uvrE*- oder *mutU*-Genprodukt) ist die Helicase II (KUSHNER *et al.*, 1978; HICKSON *et al.*, 1983).

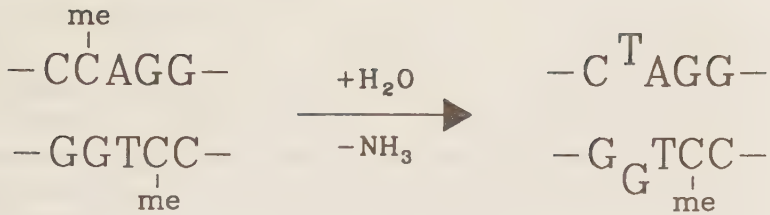
In einem *in vitro*-Reparatursystem wurde auch eine Beteiligung von "single strand-binding"-Protein (*ssb*-Protein) gezeigt.

Unklar ist, welche DNA-Polymerase an der Reparatur-Synthese beteiligt ist.

Die *Dam*-Methyltransferase erkennt hemimethylierte GATC-Sequenzen und methyliert sie an der exozyklischen Aminogruppe des C₆-Atoms des Adeninrestes.

1.3. Die "very short patch"-Reparatur (VSP): Ein zweites DNA-*mismatch*-Reparatursystem in *E. coli*

Ein besonderes Problem ergibt sich im Falle der Cytosin-Methylierung. In *E. coli* werden die beiden inneren Cytosinreste in CCA/TGG-Sequenzen am C₅-Atom des Pyrimidins von der *Dcm*-Methyltransferase modifiziert. Hier kann der 5-Methyl-Cytosinrest hydrolytisch zu Thymin (5me-Uracil) desaminieren. Dies ist der einzige bekannte Fall, bei dem eine spontane intrazelluläre Reaktion eine natürlich vorkommende Base der DNA in eine andere überführt. Es resultiert eine T/G-Fehlpaarung im Sequenzkontext der *dcm*-Erkennungssequenz (siehe Figur 1). Wenn die Desaminierung an "ruhender" (d. h. sich nicht replizierender) DNA stattgefunden hat, ist sie kein Substrat der methylierungsabhängigen *mismatch*-Reparatur (s. o.). Man hielt sie daher für nicht-reparierbar, zumal *dcm*-Erkennungssequenzen im *lacI*-Gen von COULONDRE *et al.*, 1978, als sog. "hotspots" für C→T-Transitionen beschrieben wurden.



Figur 1: Hydrolytische Desaminierung von 5-Methyl-Cytosinresten in der DNA.

Die T/G-Fehlpaarung ist das Resultat der spontanen Desaminierung eines 5-Methyl-Cytosinrestes in der *dcm*-Erkennungssequenz von *E. coli*.

Evidenz für die Reparatur solcher T/G-Fehlpaarungen erbrachte Margaret Lieb. Bei der Feinkartierung von über 90 Mutationen im *cl*-Gen des Phagen λ fielen ihr Mutationen (z. B. am6, am9, am10, am15, B36) auf, die mit eng benachbarten Markern sehr viel häufiger rekombinierten als es aus der physikalischen Distanz zu erwarten war (hohe negative Interferenz) (LIEB, 1976). In späteren Arbeiten interpretierte M. Lieb die Ergebnisse für das Allel am6 als Hinweis auf Heteroduplex-DNA-Bildung bei der Rekombination gefolgt von spezifischer Korrektur der Fehlpaarungen im Sequenzkontext der *dcm*-Erkennungssequenz. Diese Reparatur ist charakterisiert durch sehr kurze Traktlängen (weniger als sechs Nukleotide), wodurch sie sich deutlich von der methylierungsabhängigen Reparatur unterscheidet. M. Lieb bezeichnete dieses Reparatur-System als "very short patch"-Reparatur (VSP). VSP-Reparatur findet immer zugunsten der intakten *dcm*-Erkennungssequenz statt (LIEB, 1985). Substrate sind T/G-Fehlpaarungen im *dcm*-Sequenzkontext, wie sie bei der Desaminierung von 5-Methyl-Cytosinresten oder im Heteroduplex-Stadium der Rekombination entstehen. Liebs vorläufige Charakterisierung ließ offen, ob 5meC/A-Fehlpaarungen, die bei der Rekombination ebenfalls möglich sind, korrigiert werden, und ob der Cytosin-Methylierungszustand der rekombinierenden DNA-Stränge und der *dcm*-Hintergrund der zur Kreuzung verwendeten *E. coli*-Stämme einen Einfluß auf die Reparatur haben. Die von LIEB, 1983, beschriebene *mutS*-Abhängigkeit der Reparatur deutete auf eine mögliche Verwandtschaft zum bereits bekannten methylierungsabhängigen *mismatch*-Reparatursystem.

Aufgabe dieser Arbeit ist es, den Nachweis zu erbringen, daß die VSP-Reparatur nicht auf "Spezialfälle" wie die Rekombination von λ -Phagen beschränkt, sondern ein allgemeines Phänomen in *E. coli* ist. Darüberhinaus soll dieses Reparatur-System näher charakterisiert werden, indem Fragen zur Abhängigkeit von beteiligten Proteinfaktoren, Substratabhängigkeit, Substraterkennung, Wahl des Matrizenstranges usw. bearbeitet werden.

Die Untersuchung der VSP-Reparatur ist aus mehreren Gründen von allgemeinem Interesse.

Erstens: ein Reparatursystem mit kurzen Traktlängen könnte ein Modellfall für "hohe negative Interferenz" und Genkonversionsphänomene in Prokaryonten und höheren Organismen sein (KOURILSKY, 1986). So läßt sich ein gut untersuchtes Beispiel für lokalisierte Genkonversion des *amiA36*-Locus von *S. pneumoniae* mechanistisch auf ein DNA-*mismatch*-Reparatursystem mit sehr kurzen Traktlängen zurückführen (SICARD *et al.*, 1985). Somatische Genkonversionen während der B-Zell-Reifung, die zu Rearrangements in den Immunglobulingenen führen, tragen wesentlich zur Vielfalt des Antikörper-Repertoires von Hühnern bei; die ausgetauschten DNA-Abschnitte sind zwischen 10 und 120 Nukleotide lang (siehe REYNAUD *et al.*, 1987). Dieses Phänomen läßt sich durch DNA-*mismatch*-Reparatur erklären. Wegen des hohen Cytosin-Methylierungsgrades eukaryontischer DNA ist sogar ein der VSP-Reparatur analoger Mechanismus denkbar. Ein sehr ähnliches System, das zu antigener Variation des Membranpilusproteins von *Neisseria gonorrhoeae* führt, wurde von HAAS and MEYER, 1986, und SEGAL *et al.*, 1986, beschrieben.

Zweitens: die Cytosin-Methylierung hat in Eukaryonten eine weitaus größere Bedeutung als in Bakterien. Genaktivität und Differenzierung werden durch die Cytosin-Methylierung langfristig kontrolliert (DOERFLER, 1983); Mutationen, die durch Desaminierung von 5mC-Resten entstehen, führen in den einfachsten Fällen zu Polymorphismus (BARKER *et al.*, 1984) oder zur Bildung von Pseudogenen (siehe BIRD *et al.*, 1987), können aber auch Genexpression und -regulation stören und fatale Auswirkungen auf den Organismus haben. Die Analysen zur molekularen Ursache der Hämophilie A belegen dies (GRISCHER *et al.*, 1985; YOUSSEFIAN *et al.*, 1986). Daher besteht hier ebenfalls die Notwendigkeit eines spezifischen Reparatursystems, für das es inzwischen erste Hinweise gibt (BROWN and JRICNY, 1987).

Drittens: als Ursache der *hotspots* für C→T-Transitionen im *lacI*-Gen wurden von COULONDRE *et al.*, 1978, Desaminierungen von 5mC-Resten postuliert, mit der Annahme, daß die resultierenden T/G-Fehlpaarungen nicht reparierbar seien. Durch die Entdeckung des VSP-Systems ist die Frage nach der molekularen Natur der Mutations*hotspots* wieder offen.

Viertens: In früheren Arbeiten konnte von KRAMER *et al.*, 1982, 1984 b, gezeigt werden, daß sich spezifische Eigenschaften des methylierungsabhängigen *mismatch*-Reparatursystems zur Entwicklung einer allgemein anwendbaren Methode der Mutationskonstruktion mit hohen Ausbeuten anwenden lassen. Auch das VSP-Reparatursystem in *E. coli* hat ein gentechnologisches Potential; Voraussetzung für die Entwicklung neuer Methoden der gezielten Mutagenese ist die genaue Kenntnis von den Eigenschaften dieses Reparatursystems.

2. Experimenteller Teil

2.1. Medien

PB-Medium: 17,5 g Antibiotic-Medium 3 (Difco) pro Liter; autoklaviert.

dYT-Medium: 16 g Bacto-Trypton (Difco), 5 g NaCl, 10 g Hefe-Extrakt (Oxoid) pro Liter; autoklaviert.

M9-Minimalmedium: 7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 3 g KH_2PO_4 , 1 g NH_4Cl pro Liter; nach dem Autoklavieren mit 25 ml 20%ige Glukose (w/v), 1 ml 1 M CaCl_2 , 1 ml 1 M MgSO_4 , 5 ml 100 μM FeCl_3 und 1 ml Thiaminlösung (1mg/ml) komplettieren.

Top-Agar: 10 g Bacto-Trypton, 5 g NaCl, 6,5 g Agar; autoklaviert.

IPTG-Platten: 8 g Bacto-Trypton (Difco), 5 g Hefe-Extrakt (Oxoid), 5 g NaCl, 12 g Bacto-Agar (Difco) pro Liter; nach dem Autoklavieren 50 mg IPTG zusetzen.

EHA-Platten: 13 g Bacto-Trypton (Difco), 8 g NaCl, 12 g Bacto-Agar (Difco), 2 g Na-Citrat $\times 2 \text{ H}_2\text{O}$ pro Liter; nach dem Autoklavieren 7 ml 20%ige Glukose zusetzen.

M9-Minimalplatten: 7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 3 g KH_2PO_4 , 1 g NH_4Cl in 0,5 Liter Wasser autoklavieren; 15 g Bacto-Agar (Difco) in 0,5 Liter Wasser autoklavieren; nach dem Autoklavieren zusammen gießen und mit 25 ml 20%ige Glukose (w/v), 1 ml 100 mM CaCl_2 , 1 ml 1 M MgSO_4 , 5 ml 100 μM FeCl_3 und 1 ml Thiaminlösung (1 mg/ml) komplettieren.

2.2. Puffer und Lösungen

Agarosegelpuffer (AGB): 40 mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA.

Ampicillinlösung: 100 mg/ml Wasser.

Auffüllpuffer: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 60 mM Ammoniumacetat, 5 mM MgCl_2 , 5 mM DTT.

Bst NI-Puffer: 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl_2 , 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA; Inkubation bei 60 °C.

DOC-Lösung: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 % (w/v) Brij 58, 0,4 % (w/v) Deoxycholat, 62,5 mM EDTA.

Formamidfarbmarker: 0,1 % (w/v) Xylencyanol FF, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 10 mM EDTA in Formamid (deionisiert).

HPLC-Eluens A: 0,1 M Triethylammoniumacetat pH 7,0.

HPLC-Eluens B: Acetonitril.

Hybridisierungspuffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM KCl.

Kanamycinlösung: 25 mg/ml Wasser.

Kinase-Puffer: 40 mM Tris-HCl pH 9,0, 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 5 % Glycerin.

Kompromißpuffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl_2 , 50 mM NaCl, 1 mM DTT.

Ligase-Puffer: 20 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM MgCl_2 , 0,6 mM ATP, 10 mM DTT.

Phagen-Verdünnungspuffer: 20 mM Kaliumphosphat pH 7,2, 0,02 % Gelatine; autoklaviert.

SSC-Puffer: 150 mM NaCl, 15 mM Natriumcitrat.

Streptomycinlösung: 100 mg/ml Wasser.

Sucrosefarbmarker: 60 % (w/v) Sucrose, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 0,05 % (w/v) Xylencyanol FF in TBE-Puffer.

TBE-Puffer: 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA.

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,25 mM EDTA.

TES-Puffer: 30 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl.

Tetrazyklinlösung: 20 mg/ml Ethanol.

Für die DNA-Sequenzierung:

NTP-Mixe: *G-Mix:* 500 μl 0,5 mM dTTP

+ 500 μl 0,5 mM dCTP

+ 25 μl 0,5 mM dGTP

+ 16 μl 10 mM ddGTP

+ 1000 μl Wasser

A-Mix: 500 μl 0,5 mM dTTP

+ 500 μl 0,5 mM dCTP

+ 500 μl 0,5 mM dGTP

+ 1 μl 10 mM ddATP

+ 500 μl Wasser

T-Mix: 25 μl 0,5 mM dTTP

+ 500 μl 0,5 mM dCTP

+ 500 μl 0,5 mM dGTP

+ 50 μl 10 mM ddTTP

+ 1000 μl Wasser

C-Mix: 500 μl 0,5 mM dTTP

+ 25 μl 0,5 mM dCTP

+ 500 μl 0,5 mM dGTP

+ 8 μl 10 mM ddCTP

+ 1000 μl Wasser

Chase-Mix: jeweils 0,25 mM dNTP (N = G, A, T, C).

TM-Puffer: 100 mM Tris-HCl pH 8,5, 50 mM MgCl_2 .

2.3. Elektrophoresetechniken

2.3.1. Agarosegelelektrophorese

Zur analytischen oder präparativen Trennung von DNA-Fragmenten werden Flachbettgele mit einer Agarosekonzentration von 1 % bzw. 1,2 % Agarose (Seakem oder Seaplaque, Marine colloids) in AGB/0,5 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Als Probenpuffer wird der DNA-Lösung 1/2 Vol. Sucrosefarbmarker zugesetzt.

2.3.2. Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur analytischen oder präparativen Trennung von Oligonukleotiden werden Gele mit verschiedenen Polyacrylamidkonzentrationen (10 - 20 %) verwendet, die 7 M an Harnstoff (DNA-denaturierend) in TBE sind. Laufpuffer ist TBE. Das Mischungsverhältnis Acrylamid:Bisacrylamid beträgt 19:1 bei analytischen Gelen und 29:1 bei präparativen Gelen. Als Probenpuffer wird Formamid-Farbmarker verwendet.

Für DNA-Sequenzierungen werden Salzgradienten-Gele mit 6 % Polyacrylamid/Bisacrylamid 19/1 und 7 M Harnstoff verwendet. Der Salzgradient beträgt 0,5 - 4 x TBE.

2.4. DNA-Präparationstechniken

2.4.1. Großpräparation von Einzelstrang-DNA

Für die Präparation von Virion-DNA (einzelssträngige DNA, ssDNA) wird ein modifiziertes Protokoll von WALKER and GAY, 1983, benutzt.

200 ml PB-Medium werden mit 1 ml einer geeigneten Übernachtskultur und 200 ml Phagensuspension (ca. 10^{12} pfu/ml) inokuliert und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterien werden bei 4 °C abzentrifugiert (GSA-Rotor, Sorvall, 10000 rpm, 30 Minuten) und dem Überstand 6 g NaCl und 8 g PEG 6000 zugegeben. Die Lösung wird für vier Stunden auf Eis belassen. Danach werden die präzipitierten Phagen bei 4 °C abzentrifugiert (10000 rpm, GSA-Rotor, Sorvall, 30 Minuten) und der Überstand dekantiert. Das Phagensediment wird in 24 ml TES aufgenommen, mit 6 ml 10% PEG 6000/2,5 M NaCl in TES versetzt und eine weitere Stunde bei 4 °C belassen. Die präzipitierten Phagen werden bei 4 °C abzentrifugiert (Hettich, 4000 rpm, 30 Minuten), der Überstand dekantiert und das Sediment kurz getrocknet. Die Phagen werden in 3 ml TES resuspendiert und phenolisiert (1 x Phenol/TE; 1 x Phenol/TE:Chloroform 1:1; 1 x Chloroform:Isomylalkohol 24:1; 3 x Ether-

extraktion). Die DNA wird mit Ethanol präzipitiert und anschließend in 1 ml TE aufgenommen. Die Ausbeute wird photometrisch bestimmt.

2.4.2. Minipräparation von Einzelstrang-DNA zur DNA-Sequenzanalyse

2,5 ml einer 1/100 verdünnten Übernachtskultur werden mit einem Einzelplaque inokuliert und fünf Stunden bei 37 °C gerollt. 1,2 ml der Bakteriensuspension werden fünf Minuten bei Raumtemperatur in der Eppendorffzentrifuge (10000 rpm) zentrifugiert. Vorsichtig wird 1 ml Überstand entnommen und erneut fünf Minuten abzentrifugiert. 800 µl Überstand werden zu 200 µl 20 % PEG 6000/2,5 M NaCl gegeben, geschüttelt und 15 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Die präzipitierten Phagen werden bei Raumtemperatur abzentrifugiert (Eppendorf, 10000 rpm), der Überstand sorgfältig mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgehoben. Das Sediment wird in 110 µl TE resuspendiert und phenolisiert (1 x 50 µl Phenol/TE; 1 x 100 µl Phenol/TE:Chloroform 1:1). 90 µl DNA-Lösung werden mit Ethanol gefällt (mind. 1 Stunde bei -18 °C) und bei 4 °C abzentrifugiert (20 Minuten, 15000 rpm, Rotor SS34, Sorvall). Das Pellet wird mit 1 ml eiskaltem Ethanol gewaschen, abzentrifugiert und nach dem Trocknen in 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.4.3. RF-DNA-Großpräparation

Große Mengen doppelsträngiger DNA (replikative Form-DNA, RF-DNA) werden nach folgendem Protokoll präpariert:

Ein Liter PB-Medium wird mit 25 ml einer geeigneten Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C geschüttelt. Die Kultur wird bei einer O.D.₅₄₆ von 0,5 - 0,6 mit 25 ml Phagensuspension (10^{12} pfu/ml) infiziert und weitere vier Stunden bei 37 °C geschüttelt. Dann werden die Zellen bei 4 °C abzentrifugiert (3500 rpm, Hettich, 30 Minuten); der Überstand wird dekantiert, das Sediment in 22,5 ml 25% Sucrose/50 mM Tris-HCl pH 8,0 (kalt) resuspendiert. 6 ml Lysozym-Lösung (5 mg/ml 50 mM Tris-HCl pH 8,0) werden zugegeben und unter leichtem Rühren zehn Minuten auf Eis inkubiert. 7,5 ml 250 mM EDTA pH 8,0 werden zugegeben und weitere zehn Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 27,5 ml DOC-Lösung wird noch einmal zehn Minuten auf Eis inkubiert. Die nun viskose Mischung wird in Zentrifugenröhrchen gegeben und eine Stunde bei 4 °C zentrifugiert (30000 rpm, Rotor TFT 50.38, Kontron). Die Überstände (sog. "cleared lysate") werden vereinigt, das Volumen bestimmt und 0,97 g CsCl und 20 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) pro Milliliter Überstand zugegeben. Die Lösung wird in 35 ml Quickseal-Zentrifugenröhrchen gefüllt und circa 20 Stunden bei 15 °C zentrifugiert (45000 rpm, Rotor VTi50, Beckman). Die untere Bande (sie entspricht der RF-DNA) wird

gesammelt, in ein 5 ml Qickseal-Röhrchen gegeben und ein zweites Mal circa 20 Stunden bei 15 °C zentrifugiert (45000 rpm, Rotor VTi65, Beckman). Wieder wird die untere Bande gesammelt, über Nacht gegen 50 mM NaCl/10 mM Tris-HCl pH 8,0/1 mM EDTA dialysiert und phenolisiert (1 x Phenol/TE; 3 x Etherextraktion). Nach Ethanolpräzipitation wird die DNA in 1 ml TE-Puffer gelöst und die Ausbeute photometrisch bestimmt.

2.4.4. Plasmid-DNA- und RF-DNA-Minipräparation

Plasmid-DNA- und RF-DNA-Minipräparationen werden wie beschrieben durchgeführt (MANIATIS *et al.*, 1982).

2.4.5. Elektroelution aus hochschmelzenden Agarosegelen

Die Elektroelution von DNA-Fragmenten aus hochschmelzenden Agarosegelen wird nach Gebrauchsanleitung der Firma Biometra, Heidelberg, durchgeführt. Elutionspuffer ist AGB; eluiert wird eine Stunde bei 100 Volt. Die DNA wird anschließend mit Ethanol gefällt und nach Zentrifugation in 0,2 ml TE gelöst, phenolisiert (1 x Phenol/TE; 1 x Phenol/TE:Chloroform 1:1; 1 x Chloroform:Isoamylalkohol 24:1; 3 x Etherextraktion) und wieder mit Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation wird das getrocknete Sediment in 20 µl TE gelöst.

2.4.6. Extraktion aus niedrigschmelzenden Agarosegelen (nach WIESLANDER, 1979)

Nach Elektrophorese in Gelen aus Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt wird die Bande, die der gewünschten DNA entspricht, unter UV-Licht (302 nm) ausgeschnitten, mit zwei Volumen Wasser versetzt und auf 65 °C erhitzt. Die geschmolzene Agaroselösung wird phenolisiert (2 x Phenol/TE; 1 x Phenol/TE: Chloroform 1:1; 1 x Chloroform:Isoamylalkohol 24:1; 3 x Etherextraktion) und mit Ethanol gefällt. Die präzipitierte DNA wird bei 4 °C abzentrifugiert und das getrocknete Pellet in TE-Puffer gelöst.

2.4.7. Extraktion von Oligonukleotiden aus Polyacrylamidgelen (ATKINSON and SMITH, 1984; WU *et al.*, 1984)

Das Polyacrylamidgel wird auf eine Fertigplatte für die Dünnschichtchromatographie (Merck 60 F-254) gelegt und die Bande, die der gewünschten DNA entspricht, unter UV-Licht (254 nm) ausgeschnitten. Das Gelstück wird zu 500 µl Wasser in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und mit einem

Glasstab zerdrückt. Extrahiert wird über Nacht bei 65 °C. Die Gelstücke werden bei Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand phenolisiert (1 x Phenol/TE; 1 x Phenol/TE:Chloroform 1:1; 1 x Chloroform:Isoamylalkohol 24:1; 3 x Etherextraktion) und mit Ethanol gefällt. Die präzipitierte DNA wird bei 4 °C abzentrifugiert und das getrocknete Sediment in TE gelöst.

2.4.8. Reinigung von großen DNA-Fragmenten und "nicked duplex"-DNA durch Sedimentationszentrifugation in Sucrosegredienten

Sucrosegredienten von circa 7 - 30 % Sucrose werden durch Einfrieren und Auftauen einer Lösung von 18,5 % (w/v) Sucrose in 100 mM Tris-HCl pH 8,0/100 mM NaCl/10 mM EDTA/0,002 % Ethidiumbromid im Zentrifugenröhrchen gebildet. Zentrifugiert wird 14 Stunden bei 15 °C mit 30000 rpm (Rotor Sw41Ti, Beckman). Unter UV-Licht (366 nm) wird die Bande gesammelt, die der gewünschten DNA entspricht, und die DNA mit Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation wird das Sediment in TE gelöst, phenolisiert (1 x Phenol/TE; 3 x Etherextraktion) und wieder mit Ethanol präzipitiert.

2.5. DNA-Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzbestimmungen werden nach der Strangabbruch-Methode von SANGER *et al.*, 1977, durchgeführt. Dabei wird ein modifiziertes Protokoll von BANKIER and BARRELL, 1983, angewandt:

1) Anhybridisieren des "primers":

- 2 µl *template*-DNA
- + 2 µl *primer*-Mix (aus 1 µl Sequenzprimer (0,2 pMol/µl)
 - + 1 µl TM-Puffer
 - + 7 µl Wasser)

20 Minuten bei 55 °C inkubieren

2) Kettenverlängerung und Strangabbruch:

- 4 µl *primer/template*-Hybrid
- + 2 µl NTP-Mix
- + 2 µl Klenow-Mix (aus 10 mCi ³⁵S-ATP
 - + 2,5 µl 0,1 M DTT
 - + 2,5 units Klenow-Enzym
 - Wasser ad 20 µl)

15 Minuten bei 55 °C

3) "Chase"-Reaktion durch Zugabe von 2 µl *chase*-Mix;

15 Minuten bei 55 °C

4) *Abstoppen der Reaktion* durch Zugabe von 2 µl Formamid-Farbmarker;

15 Minuten bei 90 °C, Reaktionsgefäß geöffnet

1 - 2 µl werden auf ein 6% Polyacrylamid-Gradientengel (0,5 - 4 x TBE; BIGGIN *et al.*, 1983) gegeben und circa zwei Stunden bei 40 Watt gefahren.

2.6. Oligonukleotidsynthese und Aufarbeitung der synthetischen Oligonukleotide

2'-Desoxyoligonukleotide werden nach der Phosphoramiditmethode (BEAUCAGE and CARUTHERS, 1981) auf einem DNA-Synthesizer Modell 380 A (Applied Biosystems) synthetisiert. Die Oligonukleotide werden wie folgt aufgearbeitet:

Zunächst werden die Basenschutzgruppen durch Inkubation bei 55 °C (mind. sechs Stunden) in konzentriertem Ammoniak abgespalten. Der Ammoniak wird in der Speed vac-Zentrifuge mit Wasserstrahlvakuum abgezogen und die Probe getrocknet. Bei der anschließenden Reversed Phase HPLC-Reinigung wird Material mit der Tritylschutzgruppe am 5'-Ende des Oligonukleotids stark angereichert. Zur Reinigung wird eine Organogen Hd Sil 18-55-100-Säule und folgender Gradient verwendet:

t (min)	% B
0 - 1,5	10 %
1,5 - 3	10 - 15 %
3 - 13	15 - 34 %
13 - 15	34 - 40 %
15 - 17	40 - 10 %
17 - 20	10 %

Das Oligonukleotid wird in 0,2 ml Elutionspuffer A aufgenommen und durch Zentrifugation vom unlöslichen Material getrennt. Für einen analytischen Lauf wird etwa 1/100 bis 1/50, für einen präparativen Lauf etwa 1/6 bis 1/3 des Rohprodukts eingesetzt. Je nach Länge und Basenzusammensetzung eluiert das Oligonukleotid bei 25 - 30 % B. Die gesammelten HPLC-Fractionen werden getrocknet, in 0,2 ml 80%ige Essigsäure aufgenommen und zur Detritylierung 15 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wird die Essigsäure in der Speed vac-Zentrifuge mit Wasserstrahlvakuum abgezogen, mit ca. 0,5 ml Wasser versetzt und viermal mit gleichem Volumen Essigsäureethylester extrahiert. Die Oberphase wird dabei verworfen. Der restliche Essigsäureethylester wird in der Speed vac-Zentrifuge mit Wasserstrahlvakuum abgezogen und die O.D.₂₆₀ der Oligonukleotid-haltigen Lösung bestimmt. Zur präpartiven, enzymatischen 5'-Phosphorylierung wird soviel Lösung entnommen wie 1 O.D.₂₆₀ entspricht und getrocknet. Für die Kinase-Reaktion wird das Oligonukleotid in 20 µl Wasser gelöst. Dann werden 1 µl 0,1 M ATP, 0,7 µl 0,1 M DTT, 4 µl zehnfacher Kinase-Puffer, 10 Einheiten Polynukleotidkinase und

Wasser ad 40 µl zugegeben. Nach 30 Minuten bei 37 °C wird die Reaktion durch Inkubation bei 65 °C für 10 Minuten beendet, 1/2 Volumen Formamidfarbmarker zugegeben, und das Oligonukleotid durch präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.3.2.) mit anschließender Extraktion aus dem Gel (Abschnitt 2.4.7.) gereinigt.

Für Oligonukleotide, die als Sequenzierprimer verwendet werden sollen, entfällt die enzymatische 5'-Phosphorylierung.

In Tabelle 1 sind die Sequenzen der synthetischen Oligonukleotide und ihr Verwendungszweck aufgeführt.

2.7. Oligonukleotid-dirigierte Mutationskonstruktion nach der "gapped duplex"-DNA-Methode

Die Protokolle für die gezielte Mutagenese sind in KRAMER *et al.*, 1984 b, und KRAMER and FRITZ, 1987, publiziert.

Herstellung der gdDNA:

0,5 µg (0,1 pMol) RF-DNA werden mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten, mit 1,3 µg (0,5 pMol) ssDNA gemischt, 5 µl zehnfacher Hybridisierungspuffer und Wasser ad 40 µl zugegeben. Dieser Ansatz wird 3 Minuten auf 100 °C erhitzt und anschließend 10 Minuten bei 65 °C inkubiert.

Anhybridisieren des mutagenen Primers:

8 µl gdDNA werden mit 2 µl Oligonukleotidlösung (2 pMol/µl) versetzt und 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Dieser Ansatz kann entweder direkt zur Transfektion von BMH71-18*mutS* oder WK-6*mutS* verwendet werden [sog. "MHT" (*mix-heat-transfect*)-Protokoll] oder enzymatisch aufgefüllt werden.

Auffüllreaktion:

Dazu werden zum Hybridisierungsgemisch 4 µl zehnfacher Auffüllpuffer, 4 µl 2 mM NAD, 4 µl 10 mM dNTP-Lösung (je 2,5 mM dATP, dGTP, dTTP, dCTP) und 15 µl Wasser zugegeben, gemischt und die Reaktion durch Zugabe von 1 µl *E. coli*-DNA-Ligase (5 Einheiten/µl) und 1 µl T4-DNA-Polymerase (1 Einheit/µl) gestartet. Nach 15 Minuten Inkubation bei 25 °C werden 2 µl Genprodukt 32-Protein (aus T4-infizierten *E. coli*-Zellen; 2mg/ml) zugegeben und weitere 90 Minuten bei 25 °C inkubiert. Durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA und Erhitzen auf 65 °C (für zehn Minuten) wird die Reaktion gestoppt. Der Ansatz wird phenolisiert (1 x 40 µl Phenol/TE:Chloroform 1:1; 3 x Etherextraktion) und kann nach Abdampfen des Ethers zur Transfektion von BMH 71-18*mutS* oder WK-6*mutS* eingesetzt werden.

Tabelle 1: Synthetische Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendung
HKam7	d(pCCT GCA GCC <u>T</u> AG CTT GGC G)	M
RZSer7	d(pCCT GCA GCC <u>G</u> AG CTT GGC G)	M
RZGln7	d(pCCT GCA GCC <u>TG</u> G CTT GGC G)	M
Roloch17	d(pCGA CGG CCA <u>GT</u> T AAT TC)	M
Roloch28	d(pCAG GGT TTT <u>A</u> CC AGT CA)	M
Rolop22	d(pCGA CGT TGT <u>C</u> AA ACG ACG G)	M
RZSerGln	d(pTGC AGC CT <u>G</u> <u>A</u> CT TGG CGT A)	M
RZSeram	d(pCTG CAG CCT <u>AAC</u> TTG GCG T)	M
lac40oc	d(pGCG GGC CTC TTA <u>G</u> CT ATT AC)	M
lac40oc2	d(pGCG GGC <u>TTC</u> TTA <u>A</u> CT ATT ACG)	M
lac40atr	d(pCGG GCT <u>T</u> CT <u>TCA</u> CTA TTA)	M
Al26Am27	d(pGTT TTC CTA <u>GGC</u> ACG ACG TTG)	M
Al26Tp27	d(pGTT TTC CCA <u>G</u> GC ACG AC)	M
"16T"	d(pGGT TTT CCT <u>T</u> AGT CAC G)	M
RZ18	d(TGC TGC AAG GCG ATT AAG)	S
uniprimer	d(TCC CAG TCA CGA CGT)	S
revseqprimer	d(AAC AGC TAT GAC CAT G)	S
pMacprimer	d(TCG AAG ACG AAA GGG CA)	S

Die 2'-Desoxyribonukleotide wurden auf einem DNA-Synthesizer Modell 380 A (Applied Biosystems) synthetisiert. Bei Verwendung als Mutageneseprimer (M) wurden sie enzymatisch 5'-phosphoryliert; **fett-gedruckt** und unterstrichen sind diejenigen Nukleotide, die Mutationen einführen. Sequenzierprimer (S) wurden unphosphoryliert eingesetzt.

2.8. Transfektion und Transformation von *E. coli*-Stämmen

Es wird eine modifizierte Version der Methode von COHEN *et al.*, 1972, angewandt. 50 ml PB-Medium werden mit 1 ml einer Übernachtskultur des zu transfizierenden Stammes angeimpft und bis zu einer O.D.₅₄₆ von 0,4 - 0,6 bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterien werden abzentrifugiert (4000 rpm, 4 °C, Hettich) und das Sediment in 20 ml 0,1 M CaCl₂ (eiskalt) resuspendiert. Die Bakterien werden erneut abzentrifugiert und das Sediment in 10 ml 0,1 M CaCl₂ resuspendiert. Nach einer

dritten Zentrifugation wird das Sediment in 2 ml 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und mindestens 30 Minuten auf Eis belassen. 0,2 ml dieser "kompetenten" Zellen werden zu 0,1 ml DNA-Lösung in 0,1 M CaCl₂ gegeben und 90 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem "Hitzeschock" von 3 Minuten bei 45 °C wird ein Aliquot oder eine Verdünnung des Transfektionsansatzes mit 2,5 ml flüssigem Top-Agar und 0,2 ml Plattierkultur auf EHA-Platten plattiert. Die Platten werden über Nacht bei 37 °C bebrütet.

Soll eine blau/farblos Verteilung der Plaques untersucht werden, werden dem Top-Agar noch 25 - 50 µl 4%iges x-Gal in Dimethylformamid zugegeben und das Gemisch auf IPTG-Platten plattiert.

Tabelle 2: *E. coli* K12-Stämme

Stamm	relevante Marker	übrige Marker	Quelle
BMH 71-18	$\Delta(lac-proAB) supE$ F' <i>lacIq</i> Z Δ M15 <i>proA</i> ⁺ B ⁺	<i>thi</i>	Benno Müller-Hill
BMH 71-18 <i>mutH</i>	<i>mutH</i> ::Tn5 (Kan ^r)	wie BMH 71-18	Wilfried Kramer
BMH 71-18 <i>mutS</i>	<i>mutS</i> ::Tn10 (Tet ^r)	wie BMH 71-18	Wilfried Kramer
BMH 71-18 <i>mutL</i>	<i>mutL</i> ::Tn10 (Tet ^r)	wie BMH 71-18	Wilfried Kramer
WK-6	$\Delta(lac-pro)$ F' <i>lacIq</i> Z Δ M15 <i>pro</i> ⁺	<i>galE strA nal</i> ^r	Wilfried Kramer
WK-6 <i>mutH</i>	<i>mutH</i> ::Tn5 (Kan ^r)	wie WK-6	
WK-6 <i>mutS</i>	<i>mutS</i> ::Tn10 (Tet ^r)	wie WK-6	
WK-6 <i>mutL</i>	<i>mutL</i> ::Tn10 (Tet ^r)	wie WK-6	
WK 2-6-2	<i>dam-4</i> F' <i>galT</i> ::Tn5 (Kan ^r)	<i>mal</i> 354 <i>tsx</i> Tn10 (Tet ^r)	Wilfried Kramer
RHZ 1-2	<i>dcm-6 strA</i> F' <i>galT</i> ::Tn5 (Kan ^r)	wie GM 31	
RHZ 2-2	<i>dcm-6 dam-3 strA</i> F' <i>galT</i> ::Tn5 (Kan ^r)	wie GM 272	
RP 4182	$\Delta(supD dcm fla)$	<i>trp gal rpsL</i>	John S. Parkinson
GM 31	<i>dcm-6</i>	<i>thr-1 ara-14 leuB-6 tonA31 lacY-1</i> <i>glnV-44 galK-2 galT-22 hisG-4</i> <i>rpsL-136 xyl-5 mul-1 thi-1</i>	Martin Marinus
GM 272	<i>dcm-6 dam-3</i>	<i>hsdS-21 (n_k-m_k-) lacY-1 tsx-78</i> <i>supE-44 galK-2 galT-22 mul-1</i> <i>metB-1 (thi-1 tonA-31)?</i>	Martin Marinus
GM 99 F'sulII	F' <i>galT</i> ::Tn5 (Kan ^r)	<i>mal</i> 354 <i>tsx dam-4 sulII</i>	Riccardo Cortese

Für Transformationen von *E. coli* gilt bis zum "Hitzeschock" dasselbe Protokoll. Anschließend wird der Transformationsansatz zu 1 ml dYT-Medium gegeben, eine Stunde bei 37 °C gerollt und Aliquots von 0,2 ml auf Selektivplatten ausgestrichen. Die Platten werden über Nacht bei 37 °C bebrütet.

2.9. Bakterien

Die verwendeten *E. coli* K12-Stämme sind in Tabelle 2 zusammengestellt und beschrieben.

Alle Bakterienstämme werden in Glycerinkulturen aus 2 ml Bakterienkultur und 3 ml 87%igem Glycerin bei -18 °C aufbewahrt. Kurzfristig werden die BMH 71-18- und WK-6-Stämme auf M9-Minimalplatten aufbewahrt.

2.9.1. Stammkonstruktionen

Die *mut*-Derivate von WK-6 wurden durch P1-Transduktion (MILLER, 1972) konstruiert. Die P1-Lysate wurden aus den Stämmen AB 1157*mutH::Tn5*, -*mutS::Tn10* und -*mutL::Tn10* (Quelle G. Walker) hergestellt.

RHZ 1-2 wurde aus einem spontan Streptomycin-resistenten Derivat von GM 31 konstruiert, das gegen WK 2-6-2 gekreuzt (MILLER, 1972) wurde. Streptomycin- und Kanamycin-resistente Klone wurden auf M13-Infizierbarkeit und den richtigen *dam*- und *dcm*-Phänotyp getestet. RHZ 2-2 wurde in analoger Weise aus einem Streptomycin-resistenten GM 272-Derivat konstruiert, das gegen GM 99 F'*suIII* gekreuzt wurde.

2.10. Phagen

M13mp2, seine Derivate M13mp2op11 und M13mp2Z1, M13mp9, das *amber*-Codons in den Genen I und II besitzt (MESSING and VIEIRA, 1982), wodurch ein Wachstum nur in geeigneten Suppressor-Stämmen möglich ist, und die spontane Revertante M13mp9rev, die sich auch in Su-Stämmen vermehren kann, sowie M13mp9revam16 sind beschrieben (KRAMER *et al.*, 1984 a, b).

Alle Phagen-Stämme, die zur Untersuchung der *mismatch*-Reparatur verwendet wurden, sind in Tabelle 3 aufgeführt und beschrieben.

Tabelle 3: M13mp9-Derivate, die zur Untersuchung der *mismatch*-Reparatur verwendet wurden

Name	von M13mp9rev abweichende Punktmutationen im <i>lacZ</i> -Gen				Plaques- phänotyp
	Codon- Nr.	WT-Codon	mutiertes Codon		
M13mp9rev	-	-	-	-	blau
M13mp9revam16	16	TGG (Trp)	zu	TAG (amber)	farblos
M13mp9revGln4.3	4.3	TTG (Leu)	zu	CAG (Gln)	blau
M13mp9revam4.3	4.3	TTG (Leu)	zu	TAG (amber)	farblos (sup.)*
M13mp9revGln4.3oc6	4.3	TTG (Leu)	zu	CAG (Gln)	farblos
M13mp9revGln4.3op11	6	TCA (Ser)	zu	TAA (ochre)	farblos
	4.3	TTG (Leu)	zu	CAG (Gln)	
M13mp9revGln4.3oc17	11	TTA (Leu)	zu	TGA (opal)	farblos
	4.3	TTG (Leu)	zu	CAG (Gln)	
M13mp9revGln4.3oc40	17	GAA (Glu)	zu	TAA (ochre)	farblos
	4.3	TTG (Leu)	zu	CAG (Gln)	
M13mp9revGln4.3oc40ATR	40	GAA (Glu)	zu	TAA (ochre)	farblos
	4.3	TTG (Leu)	zu	CAG (Gln)	
	39	AGC (Ser)	zu	AGT (Ser)	
	40	GAA (Glu)	zu	TAA (ochre)	
M13mp9revGln4.3ATR	41	GAG (Glu)	zu	GAA (Glu)	blau
	4.3	TTG (Leu)	zu	CAG (Gln)	
	39	AGC (Ser)	zu	AGT (Ser)	
M13mp9revam4.3ATR	41	GAG (Glu)	zu	GAA (Glu)	farblos (sup.)*
	4.3	TTG (Leu)	zu	TAG (amber)	
	39	AGC (Ser)	zu	AGT (Ser)	
M13mp9revAGT4.2Gln4.3	41	GAG (Glu)	zu	GAA (Glu)	blau
	4.2	AGC (Ser)	zu	AGT (Ser)	
	4.3	TTG (Leu)	zu	CAG (Gln)	
M13mp9revAGT4.2am4.3	4.2	AGC (Ser)	zu	AGT (Ser)	farblos (sup.)*
	4.3	TTG (Leu)	zu	TAG (amber)	
M13mp9revAla15	15	GAC (Asp)	zu	GCC (Ala)	blau
M13mp9revAla15am16	15	GAC (Asp)	zu	GCC (Ala)	farblos
	16	TGG (Trp)	zu	TAG (amber)	
M13mp9revoc6Ala15	6	TCA (Ser)	zu	TAA (ochre)	farblos
	15	GAC (Asp)	zu	GCC (Ala)	
M13mp9revop11Ala15	11	TTA (Leu)	zu	TGA (opal)	farblos
	15	GAC (Asp)	zu	GCC (Ala)	
M13mp9revSer4.3	4.3	TTG (Leu)	zu	TCG (Ser)	blau
M13mp9revSer4.3am16	4.3	TTG (Leu)	zu	TCG (Ser)	farblos
	16	TTG (Leu)	zu	TAG (amber)	
M13mp9revam4.3op11	4.3	TTG (Leu)	zu	TAG (amber)	farblos
	11	TTA (Leu)	zu	TGA (opal)	

M13mp9rev und M13mp9revam16 sind in KRAMER *et al.*, 1984 b, beschrieben; M13mp9revGln4.3, M13mp9revam4.3, M13mp9revAla15 und M13mp9revAla15am16 sind in ZELL and FRITZ, 1987, beschrieben. M13mp9rev ist eine spontane Revertante von M13mp9, die sich auch in Su⁻-Stämmen vermehren kann. Bis auf M13mp9revam4.3ATR wurden alle Mutanten durch Oligonukleotid-dirigierte Mutagenese (siehe Abschnitt 2.8.) konstruiert.

Zur DNA-Sequenz des M13mp9rev-Phagen und zur Codon-Nummerierung siehe die Figuren 3, 5 und 8.

* farblos der Plaquephänotyp in Su⁻-Stämmen, blau in Su⁺-Stämmen

Phagensuspensionen, die normalerweise einen Titer zwischen 10^{10} und 10^{12} pfu/ml haben, wurden aus Überständen infizierter Kulturen hergestellt und sind bei 4 °C über längere Zeit haltbar.

2.10.1. Phagenkonstruktionen

Die verwendeten M13mp9rev-Derivate wurden durch gezielte Mutagenese hergestellt. Abgesehen von M13mp9revam4.3ATR, bei der die Mutation durch Umklonierung eines 119 Nukleotide langen Eco RI-Pvu I-Fragmentes von M13mp9revGln4.3ATR in das große Eco RI-Pvu I-Fragment von M13mp9revam4.3op11 konstruiert wurde, wurde bei allen übrigen M13mp9rev-Derivaten die Mutation durch Oligonukleotid-dirigierte Mutationskonstruktion (siehe Abschnitt 2.8.) in das Genom eingeführt. Nur bei der Konstruktion von M13mp9revam4.3 und M13mp9revAla15am16 konnte die von KRAMER *et al.*, 1984 b, beschriebene mp9/mp9rev-Selektion angewandt werden, die zu Ausbeuten bis zu 80 % an Phagen mit geändertem Plaquephänotyp führen. In allen anderen Fällen fand keine Selektion auf Mutanten statt; sie ließen sich nur anhand ihres geänderten Plaquephänotyps erkennen. Die Ausbeuten zeigen daher starke Schwankungen von Experiment zu Experiment und liegen deutlich unter den beschriebenen.

In Tabelle 4 sind Einzelheiten zur Konstruktion der verwendeten Phagen dargestellt.

Tabelle 4: Oligonukleotid-derivatierte Mutationskonstruktionen

Name	gdDNA aus ssDNA/RF-DNA-Fragment	mutagener primer	Transfektionswirt	Ausbeute	Methode
M13mp9revam4.3	ssM13mp9/gr. Pvu II-Fr. M13mp9rev	HKam17	BMH 71-18mutS	60 %	Auffüllreaktion*
M13mp9revGln4.3	ssM13mp9revam4.3/gr. Eco RI-Pvu I-Fr. M13mp9rev	RZGln7	BMH 71-18mutS	15 %	MHT
M13mp9revSer4.3	ssM13mp9revam4.3/gr. Eco RI-Pvu I-Fr. M13mp9rev	RZSer7	BMH 71-18mutS	21 %	MHT
M13mp9revSer4.3am16	ssM13mp9revSer4.3/gr. Eco RI-Pvu I-Fr. M13mp9revSer4.3	"16T"	BMH 71-18mutS	-	Auffüllreaktion
M13mp9revGln4.3op11	ssM13mp9revGln4.3/gr. Eco RI-Pvu I-Fr. M13mp9revGln4.3	119 Nucleotide	BMH 71-18mutS	6 %	MHT
		langes Eco RI/Pvu I			
		Fr. von M13mp2op11			
M13mp9revGln4.3oc6	ssM13mp9revGln4.3/gr. Pvu II-Fr. M13mp9revGln4.3	Roloch17	BMH 71-18mutS	18 %	Auffüllreaktion
M13mp9revGln4.3oc17	ssM13mp9revGln4.3/gr. Pvu II-Fr. M13mp9revGln4.3	Roloch28	BMH 71-18mutS	15 %	Auffüllreaktion
M13mp9revAla15am16	ssM13mp9/gr. Eco RI-Pvu I-Fr. M13mp9rev	AD6Am27	WK-6mutS	71 %	Auffüllreaktion
M13mp9revAla15	ssM13mp9revAla15am16/gr. Eco RI-Pvu I-Fr. M13mp9revam16	AD6Tp27	BMH 71-18mutS	-	Auffüllreaktion
M13mp9revAGT4.2am4.3	ssM13mp9revGln4.3/gr. Pvu II-Fr. M13mp9revGln4.3	RZSeram	WK-6mutS	51 %	Auffüllreaktion
M13mp9revAGT4.2Gln4.3	ssM13mp9revam4.3/gr. Pvu II-Fr. M13mp9revam4.3	RZSerGln	WK-6mutS	56 %	Auffüllreaktion
M13mp9revvp11Ala15	ssM13mp9revAla15/gr. Pvu II-Fr. M13mp9rev	Rolop22	BMH 71-18mutS	6 %	Auffüllreaktion
M13mp9revoc6Ala15	ssM13mp9revAla15/gr. Pvu II-Fr. M13mp9revAla15	Roloch17	BMH 71-18mutS	7 %	Auffüllreaktion
M13mp9revam4.3op11	ssM13mp9revam4.3/gr. Eco RI-Pvu I-Fr. M13mp9revam4.3	Rolop22	BMH 71-18mutS	43 %	Auffüllreaktion
M13mp9revGln4.3oc40	ssM13mp9revGln4.3/gr. Eco RI-Pvu I-Fr. M13mp9revGln4.3	lac40oc	BMH 71-18mutS	23 %	Auffüllreaktion
M13mp9revGln4.3oc40ATR	ssM13mp9revGln4.3/gr. Eco RI-Pvu I-Fr. M13mp9revGln4.3	lac40oc2	BMH 71-18mutS	23 %	Auffüllreaktion
M13mp9revGln4.3ATR	ssM13mp9revGln4.3oc40ATR/gr. Eco RI-Pvu I-Fr. M13mp9revGln4.3oc17	lac40atr	BMH 71-18mutS	36 %	Auffüllreaktion

Zur Beschreibung der Phagenstämme siehe Tabelle 3 und die Figuren 3, 5, 8.

Die gdDNA wurde aus Einzelstrang-DNA (ssDNA) hergestellt, an die der (-)Strang eines geeigneten RF-DNA-Fragmentes hybridisiert war. Die Sequenzen der mutagenen primer sind in Tabelle 1 aufgeführt. Bei der MHT-Methode wird auf eine enzymatische Auffüllreaktion und Ligation verzichtet; für die gap-Auffüllreaktion wird T4-DNA-Polymerase und *E. coli*-DNA-Ligase verwendet (KRAMER und FRITZ, 1987).

* Auffüllreaktion mit Klenow-Enzym und T4-DNA-Ligase (nach KRAMER *et al.*, 1984 b)

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Das experimentelle System

Zur Untersuchung von DNA-*mismatch*-Reparatur *in vivo* ist es notwendig, Heteroduplex-DNAs mit definierten Fehlpaarungen und Methylierungszuständen konstruieren und deren intrazelluläres Schicksal verfolgen zu können.

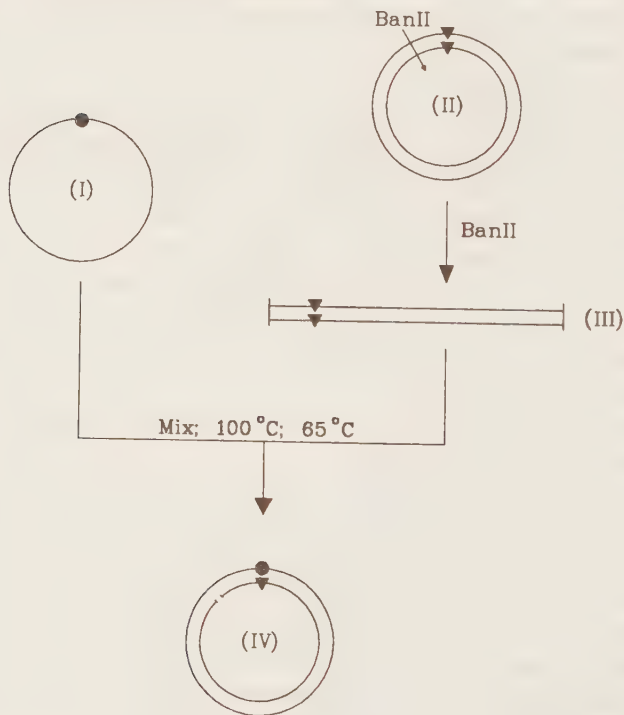
Für diese Arbeit wurde daher das experimentelle System von KRAMER *et al.*, 1984 a (auch ausführlich beschrieben in B. KRAMER, 1986), verwendet. In diesem System werden die Heteroduplex-DNAs aus der DNA alleler Phagenstämme gewonnen, deren Genome sich nur in definierten Punktmutationen im *lacZ*- α -Genfragment unterscheiden (siehe Tabelle 3). Je nach Art der Punktmutation zeigen die Phagen einen farblosen oder blauen Plaquephänotyp auf IPTG/x-Gal-Indikatorplatten unter Verwendung von BMH 71-18 oder WK-6 (Su-) als Plattierkultur. Die Expression von β -Galactosidase-Aktivität, die zum blauen Plaquephänotyp führt, wird durch die Synthese eines enzymatisch zunächst inaktiven Proteinfragmentes ermöglicht, das vom F'-Episom kodiert ist, und erst nach M13-Infektion durch ein Phagen-kodiertes α -Peptid zu einem aktiven Enzym komplementiert werden kann (LANGLEY *et al.*, 1975). Diese sog. " α -Komplementation" kann durch Mutationen im *lacZ*-Genfragment des M13mp9rev-Phagen experimentell beeinflusst werden.

Zur Konstruktion der Heteroduplex-DNAs (siehe Figur 2) wird einzelsträngige, zirkuläre DNA [(+)Strang], die aus Virionen gewonnen wird, mit linearisierter RF-DNA [(+) und (-)Strang] aus infizierten *E. coli*-Zellen gemischt, thermisch denaturiert und renaturiert. Neben der Heteroduplex-DNA mit einem "*nick*" im (-)Strang (daher "*nicked-duplex*"-DNA, ndDNA) erhält man linearen und überschüssigen zirkulären Einzelstrang sowie renaturierte lineare RF-DNA. Mittels Sedimentationszentrifugation durch einen Sucrosegradienten wird die ndDNA von der einzelsträngigen DNA gereinigt. *Nicked-duplex* DNA-Präparationen enthalten immer einen Anteil linearisierter RF-DNA, die aber in den Transfektionsexperimenten wegen der allgemein schlechten Transfektionseffizienz linearer DNA nicht stört (B. KRAMER, 1986).

Die ndDNAs werden zur Transfektion verschiedener Reparatur-profizienter und -defizienter CaCl₂-behandelter *E. coli*-Stämme eingesetzt.

Ein Aliquot des Transfektionsansatzes wird direkt plattiert. Dies erlaubt einmal die Überprüfung der Transfektionseffizienz, zum anderen ermöglicht es Aussagen über die Effizienz der Reparatur, denn die Transfektion von Heteroduplex-DNAs mit effizienter Reparatur von Fehlpaarungen führt zu Plaques mit einheitlichem farblosen oder blauen Plaquephänotyp, während die Transfektion von Heteroduplex-DNAs

ohne nachfolgender Reparatur der Fehlpaarungen zu Plaques mit sektoriertem Phänotyp führt, bestehend aus farblosen und blauen Anteilen (Sektoren). Da es oft nicht leicht ist, zwischen einheitlichen und sektorierten Plaques zu unterscheiden (besonders bei Verwendung von WK-6 als Plattierkultur, bei dem allgemein die blauen Plaques sehr viel heller erscheinen als bei BMH 71-18 als Plattierkultur), werden blaue und sektorierte Plaques zusammengefaßt und als sog. "farbige" Plaques den farblosen Plaques gegenübergestellt.



Figur 2: Konstruktion von "nicked-duplex" DNA (ndDNA)

Einzelsträngige DNA (I) wird mit Ban II-linearisierter Replikative Form-DNA (RF-DNA) (II) im molaren Verhältnis 1:5 gemischt. Durch thermisches Denaturieren (5 Minuten bei 100 °C) in 1 x SSC und Renaturieren (10 Minuten bei 65 °C) bildet sich die ndDNA, die durch Sedimentationszentrifugation durch einen Sucrosegradienten von überschüssiger zirkulärer und linearer Einzelstrang-DNA sowie renaturierter linearer Doppelstrang-DNA gereinigt (hier nicht dargestellt). Die Symbole ▼ und ● sollen verschiedene genetische Marker darstellen.

Der Rest des Transfektionsansatzes wird zur Infektion einer Übernachtskultur verwendet. Aus dieser Kultur wird eine Phagensuspension gewonnen, die zur Reinfektion von BMH 71-18 oder WK-6 bei niedriger *m.o.i.* (*multiplicity of infection*)

zur Vermeidung von Doppelinfektionen dient. In diesem Schritt wird das Verhältnis der Phagen mit blauem zu Phagen mit farblosen Plaquephänotyp bestimmt; zusammen mit dem Ergebnis der Transfektion reflektiert es Effizienz und Richtung der Reparatur (KRAMER *et al.*, 1984 a).

3.2. Direkter Nachweis der VSP-Reparatur

Für diese Studie wurden aus mehreren Gründen M13mp9rev-Phagen gewählt:

Erstens: Sie stellen ein neues experimentelles System zur Untersuchung der VSP-*mismatch*-Reparatur dar, das sich bei der Untersuchung der methylierungsabhängigen Reparatur bewährt hat und folgende Voraussetzung erfüllt: Bei der Desaminierung von 5-Methyl-Cytosinresten in *dcm*-Erkennungssequenzen kann ein "amber"-Stopcodon im lädierten DNA-Strang entstehen (siehe Figur 1). Solche *dcm*-Sequenzen lassen sich zur Untersuchung der VSP-Reparatur heranziehen, wenn sie sich phänotypisch von den Wildtyp-Sequenzen unterscheiden. Das *lacZ*- α -Genfragment bietet solche Möglichkeiten in den Codons 4.2./4.4. und 15/16 (siehe Figur 3).

Zweitens: Die Transfektion *in vitro*-konstruierter Heteroduplex-DNAs zeigt direkt die *mismatch*-Reparatur, während sich *mismatch*-Reparatur durch Kreuzungsexperimente nur indirekt erschließen läßt. Gleichzeitig zu dieser Studie wurden aus ähnlichem Grund im Labor von Miroslav Radman, Paris, Arbeiten zur VSP-Reparatur mit *in vitro* konstruierten λ -Heteroduplex-DNAs begonnen. Es wurden dafür die von M. LIEB, 1983, beschriebenen Phagenstämme herangezogen (siehe JONES *et al.*, 1987 a, c).

Drittens: Die Variation des Versuchssystems (M13- statt λ -Phagen) und die Analyse der *dcm*-Sequenzen in geänderter Sequenzumgebung unterstützen die Hypothese eines zusätzlichen DNA-*mismatch*-Reparatursystems.

Durch gezielte Mutagenese wurden aus M13mp9rev-Phagen alle Stämme konstruiert, die zusätzliche *dcm*-Sequenzen im *lacZ*-Genfragment besitzen (M13mp9revGln4.3 mit der Sequenz CCAGG im Bereich der Codons 4.2 bis 4.4 und M13mp9revAla15 mit CCTGG in den Codons 15 und 16; siehe Figur 3); diese Phagen haben einen blauen Plaquephänotyp. Zwei weitere, allele M13mp9rev-Phagen haben Transitionsmutationen in diesen Sequenzen (M13mp9revam4.3 mit der Sequenz CTAGG und M13mp9revAla15am16 mit CCTAG); diese Mutationen führen zu farblosen Plaquephänotypen. Aus den DNAs dieser Phagenstämme wurden zwei Sets von ndDNAs präpariert, die dem Ergebnis der Desaminierungsreaktion entsprechen (siehe Figur 4). Bearbeitet wurden eine T/G- (Set I) und eine G/T-Fehlpaarung (Set II), damit Effekte durch "unspezifischen Strangverlust" erkennbar

werden. Der Einfluß der methylierungsabhängigen Reparatur wurde durch Variation der Adenin-Methylierungszustände untersucht. Die Ergebnisse der Transfektionsexperimente sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Diese Tabelle enthält zum Vergleich auch die Ergebnisse von Transfektionsexperimenten mit ndDNAs, die eine "normale" T/G-Fehlpaarung im Codon 23 haben (siehe auch Figur 3)(KRAMER *et al.*, 1984 a).

	1	2	3	4	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6	4.7	4.8	4.9
	Thr	Met	Ile	Thr	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Gly	Arg	Arg	Ile
5'-ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	CCA	AGC	TTG	GCT	GCA	GGT	CGA	CGG	ATC
3'-TAC	TGG	TAC	TAA	TGC	GGT	TCG	AAC	CGA	CGT	CCA	GCT	GCC	TAG
							↓						
							am4.3:	TAG					
								ATC					
							↓						
							Gln4.3:	CAG					
								GTC					
4.10	4.11	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Pro	Gly	Asn	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Leu	Gln	Arg	Arg	Asp	Trp
CCC	GGG	AAT	TCA	CTG	GCC	GTC	GTT	TTA	CAA	CGT	CGT	GAC	TGG
GGG	CCC	TTA	AGT	GAC	CGG	CAG	CAA	AAT	GTT	GCA	GCA	CTG	ACC
												↓	
												Ala15:	GCC TGG
													CGG ACC
												↓	
												Ala15am16:	GCC TAG
													CGG ATC
17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
Glu	Asn	Pro	Gly	Val	Thr	Gln	Leu	Asn	Arg	Leu	Ala	Ala	
GAA	AAC	CCT	GGC	GTT	ACC	CAA	CTT	AAT	CGC	CTT	GCA	GCA-3'	
CTT	TTG	GGA	CCG	CAA	TGG	GTT	GAA	TTA	GCG	GAA	CGT	CGT-5'	
						↓							
						oc23:	TAA						
							ATT						

Figur 3: Mutationen in der N-terminalen Region des *lacZ*-Genfragmentes von M13mp9rev zur Untersuchung der VSP-Reparatur.

Die Codon-Nummerierung ist vom Wildtyp-*lacZ*-Gen (KALNINS *et al.*, 1983) abgeleitet. Die Insertion der "polylinker"-Region des Phagen M13mp9rev (MESSING and VIEIRA, 1982) ist durch die Nummern 4.1 bis 4.11 angedeutet. Die Mutation *lacZoc23* ist in KRAMER *et al.*, 1984 a, beschrieben. Zur Konstruktion der übrigen Mutationen siehe den Abschnitt "Experimenteller Teil".

Tabelle 5: Reparatur zweier T/G-Fehlpaarungen in *dem*-Erkennungssequenzen

A) Fehlpaarung in Codon 4.3 und Codon 16		B) Fehlpaarung in Codon 23a	
Fehlpaarung (+)Strang/ (-)Strang	Plaque- phänotyp des (-)Strang- markers	Zustand der Adenin- methylierung	Fehlpaarung (+)Strang/ (-)Strang
T/G Codon 4.3 (Set I)	blau	WK-6/BMH 71-18	BMH 71-18
		(-)Strangmarkerausbeute	(-)Strangmarkerausbeute
		nach Transfektion	nach Reinfektion
		97 % (4/0) 98 % (4/1) 70 % (8/8) 87 % (8/7)	78 % 90 % 30 % 51 %
G/T Codon 16 (Set II)	farblos	me+/me+ me-/me+ me+/me- me-/me-	T/G
		me+/me+ me-/me+ me+/me- me-/me-	
		8 % (3/1) 51 % (3/8) 6 % (3/1) 34 % (3 5)	9 % (3/2) 52 % (3/5) 7 % (3/2) 34 % (3 5)

Die "Nicked duplex"-DNAs mit T/G (G/T)-Fehlpaarungen in den Codons 4.3 und 16 sind in der Figur 4 dargestellt. Als Transfektionswirt für die ndDNAs von Set I wurde WK-6 benutzt, für die ndDNAs von Set II BMH 71-18. Beide Stämme unterscheiden sich nicht in relevanten genetischen Markern mit der Ausnahme des *supE*-Allels in BMH 71-18. Die Mutation *lacZ*am4.3 läßt sich durch *supE* supprimieren, die Mutation *lacZ*Ala15am 16 nicht. Jeder Prozentwert repräsentiert den Mittelwert mehrerer Experimente, auf die nächste ganze Zahl gerundet. Die Anzahl der durchgeführten Experimente ist in der Klammer daneben angegeben (linke Zahl); die rechte Zahl der Klammer gibt die maximale Abweichung eines individuellen Experiments vom Mittelwert an. Die Zahl der gezählten Plaques pro individuellem Experiment liegt normalerweise zwischen 500 und 2000 Plaques sowohl für die Transfektion als auch für die Reinfektion.

3.3. Die Verwandtschaft der VSP-Reparatur zur methylierungsabhängigen DNA-mismatch-Reparatur

Die methylierungsinstruierte DNA-mismatch-Reparatur ist von intaktem MutS- und MutL-Protein abhängig und benötigt MutH-Protein zur Adeninemethylierungsabhängigen DNA-Strangunterscheidung. Als zweites mismatch-Reparatursystem in *E. coli* könnte die VSP-Reparatur eine ähnliche Abhängigkeit von einigen dieser Proteine zeigen. Eine *mutS*-Abhängigkeit der VSP-Reparatur ist schon von M. LIEB, 1983, beobachtet worden.

Für diese Untersuchung wurden Derivate von WK-6 und BMH 71-18 mit Mutationen in den Loci *mutS*, *mutL* und *mutH* auf Reparatur der T/G-Fehlpaarungen in den ndDNA-Sets I und II getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Sowohl für *mutS* als auch für *mutL* ergibt sich, daß beide T/G-Fehlpaarungen nur sehr ineffizient oder gar nicht repariert werden: der große Anteil sektorierter Plaques wird durch den großen Unterschied in den (-)Strangmarkerausbeuten nach Transfektion und Reinfektion belegt. Die Mittelwerte der (-)Strangmarkerausbeuten liegen bei 73,5 % für Set I und 69,5 % für Set II. Sie sind damit nur wenig höher als die Werte für die T/G-Fehlpaarung in Codon 23, die von KRAMER *et al.*, 1984 a, ermittelt wurden, und könnten auf eine Rest-Reparaturaktivität beruhen.

In den *mutH*-Stämmen werden die T/G-Fehlpaarungen unabhängig von der *dam*-Methylierung hoch-effizient zugunsten des DNA-Stranges mit intakter *dcm*-Sequenz repariert; der Mittelwert der (-)Strangmarkerausbeute liegt bei 97 % für Set I und 9 % für Set II.

Die VSP-Reparatur ist *mutS*- und *mutL*-abhängig, aber nicht von *mutH* und der *dam*-Methylierung. Dieses Ergebnis wurde inzwischen auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt (LIEB *et al.*, 1986; LIEB, 1987; JONES *et al.*, 1987 a; MESELSON, 1987). Darüberhinaus konnten JONES *et al.*, 1987 a, c, zeigen, daß die VSP-Reparatur auch unabhängig von *uvrD* ist, das für die methylierungsabhängige Reparatur notwendig ist.

3.4. Die Konkurrenz zwischen den verschiedenen DNA-mismatch-Reparatursystemen

T/G-Fehlpaarungen sind generell gute Substrate für die methylierungsabhängige mismatch-Reparatur (KRAMER *et al.*, 1984 a; DOHET *et al.*, 1985). Darüberhinaus wurde in derselben Studie von KRAMER *et al.*, 1984 a, auch die Reparatur der T/G-Fehlpaarung im *mutH*-Hintergrund beobachtet. Diese Reparatur erfolgte unabhängig

Tabelle 6: Einfluß der Loci *mutH*, *mutS* und *mutL* auf die VSP-Reparatur

Fehlpaarung	Zustand der Adenin-methylierung	<i>mutH</i>				<i>mutS</i>				<i>mutL</i>			
		(-)Strang/		nach		(-)Strangmarkerausbeute		nach		(-)Strangmarkerausbeute		nach	
		(+)Strang/	(-)Strang	Transfektion	Reinfektion	Transfektion	Reinfektion	Transfektion	Reinfektion	Transfektion	Reinfektion	Transfektion	Reinfektion
T/G Codon 4,3 (Set I)	me+/me+			98 %	(4/1)	98 %	(4/1)	90 %	(3/3)	76 %	(3/3)	87 %	(3/0)
	me-/me+			97 %	(4/1)	98 %	(4/1)	90 %	(4/3)	74 %	(4/5)	89 %	(3/1)
	me+/me-			95 %	(4/2)	96 %	(4/3)	89 %	(4/2)	76 %	(4/2)	88 %	(3/1)
	me-/me-			96 %	(4/2)	97 %	(4/2)	88 %	(4/3)	76 %	(4/3)	87 %	(3/3)
G/T Codon 16 (Set II)	me+/me+			6 %	(2/1)	11 %	(2/1)	39 %	(2/3)	71 %	(2/1)	40 %	(2/0)
	me-/me+			6 %	(2/1)	10 %	(2/2)	36 %	(2/4)	68 %	(2/2)	36 %	(2/4)
	me+/me-			5 %	(2/1)	9 %	(2/0)	39 %	(2/3)	71 %	(2/0)	36 %	(2/3)
	me-/me-			5 %	(2/1)	7 %	(2/0)	37 %	(2/3)	69 %	(2/3)	35 %	(2/3)

Die Durchschnittswerte wurden ermittelt und dargestellt wie in der Legende zu Tabelle 5 angegeben. Der (-)Strang-kodierte Plaquephänotyp ist blau für die ndDNAs von Set I und farblos für die ndDNAs von Set II. Die *mutH*-, *mutS*- und *mutL*-Derivate von WK-6 wurden für die Experimente mit Set I, die entsprechenden BMH 71-18-Stämme für Set II verwendet; für die Reinfektionen wurden die jeweiligen Wildtyp-Stämme benutzt.

von der *dam*-Methylierung mit schwacher Bevorzugung des (-)Stranges. Da für die Replikation des M13-Phagen nach dem "rolling circle"-Mechanismus durch die Gen II-Endonuclease ein persistierender *nick* (Einzelstrangbruch) im (+)Strang gesetzt wird (siehe KORNBERG, 1980), wurde von B. KRAMER, 1986, die Hypothese entwickelt, daß die methylierungsinstruierte Reparatur eigentlich eine *nick*-instruierte Reparatur ist, bei der der *nick* durch das "*dam/mutH*"-System immer spezifisch auf den unmethylierten DNA-Strang gesetzt wird (siehe auch MANARELLI *et al.*, 1985). Im *mutH*-Hintergrund fällt diese Instruktion weg, sodaß zufällige *nicks* auf der Heteroduplex-DNA, der Ban II-*nick* auf dem (-)Strang und der gezielte *nick* durch das M13-kodierte Gen II-Protein zu einer wenig ausgeprägten (-)Strangbevorzugung in ndDNAs aus M13-Genomen führen. Eine *nick*-instruierte *mismatch*-Reparatur unmethylierter ϕ X174-Heteroduplex-DNAs wurde inzwischen auch von LÄNGLE-ROUAULT *et al.*, 1987, in Temperatur-sensitiven Ligase-defizienten *E. coli*-Stämmen beschrieben.

Die übereinstimmenden Substraterkennungsspezifitäten lassen in den Transfektionsexperimenten eine Konkurrenz zwischen den Reparatursystemen erwarten.

In diesem Abschnitt soll daher versucht werden, diese Konkurrenz, die wahrscheinlich nur für die Transfektion von Heteroduplex-DNAs relevant ist, zu quantifizieren.

Folgende Überlegung liegt diesem Modell zugrunde (siehe auch ZELL and FRITZ, 1987):

Die Zahl der verschiedenen Reparaturmechanismen, die um die Prozessierung einer gegebenen Fehlpaarung konkurrieren, sei n , und jeder dieser Mechanismen habe den charakteristischen Strang "*bias*" b_i , der entweder experimentell ermittelt oder abgeschätzt wird. Als Strang*bias* wird der Anteil der Reparatur mit dem (-)Strang als Matrize in Prozent bezeichnet. Der Wahrscheinlichkeitsfaktor w gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit die untersuchte Fehlpaarung der Heteroduplex-DNA durch den einen oder anderen Mechanismus prozessiert wird; die Summe der Wahrscheinlichkeitsfaktoren ist demzufolge gleich eins. Das Produkt aus Wahrscheinlichkeitsfaktor und Strang*bias*-faktor entspricht der simulierten Markerausbeute Y_S , die - über alle Mechanismen n summiert - bei geeigneter Wahl der Faktoren w_i und b_i der experimentell ermittelten Markerausbeute Y_E angeglichen werden kann. Dann gilt:

$$\sum_{i=1}^n w_i = 1 ; \quad Y_S = \sum_{i=1}^n w_i \times b_i \quad \text{und} \quad Y_S = Y_E$$

Der einfachste zu untersuchende Fall ist im *mutH*-Hintergrund die Reparatur der

T/G-Fehlpaarung in Codon 23, die kein Substrat der VSP-Reparatur ist. Die (-)Strangmarkerausbeuten liegen - unabhängig von der *dam*-Methylierung - bei durchschnittlich 74 % (B. KRAMER, 1986; siehe auch Tabelle 7). Die methylierungsunabhängige Reparatur ist hier das einzige in Betracht kommende Reparatursystem, w ist daher gleich eins und $b = 74$. Für das VSP-Reparatur-System wird $b = 100$ für Set I und $b = 0$ für Set II gesetzt, weil angenommen werden kann, daß es eine sehr hohe intrinsische Selektivität zugunsten des DNA-Strangs mit der intakten *dcm*-Sequenz hat, um seiner vermuteten antimutagenen Funktion zu entsprechen. Für die Fehlpaarungen in Codon 4.3 und Codon 16 ergeben sich dann folgende Gleichungen:

$$\text{Set I} \quad 98 = 100 w + 74 (1 - w)$$

$$\text{Set II} \quad 11 = 0 w + 74 (1 - w)$$

Die Gleichungen gehen auf, wenn $w = 0,9$ gesetzt wird (siehe Tabelle 7).

Die VSP-Reparatur ist also neunmal so effizient wie die methylierungsunabhängige *nick*-instruierte Reparatur.

Die Transfektion der Wildtyp-Stämme mit den ndDNAs demonstriert die methylierungsinstruierte Reparatur der Fehlpaarungen: Hemimethylierte ndDNAs mit T/G-Fehlpaarungen in Codon 23 werden deutlich zugunsten des methylierten Stranges repariert; in unmethylierter ndDNA ist keiner der beiden Stränge bevorzugt (daher die Markerausbeute um 50 %), während in vollmethylierter ndDNA die Methylierung der GATC-Sequenzen die methylierungsinstruierte Reparatur verhindert, sodaß nur die *nick*-instruierte Reparatur zu beobachten ist (die Markerausbeute liegt etwa bei dem Wert, der schon im *muth*-Stamm gemessen wurde).

Anders ist die Situation bei der Transfektion von ndDNAs von Set I und Set II: die vollmethylierten ndDNAs liefern ein Ergebnis, das qualitativ und quantitativ den Experimenten in *muth*-Stämmen entspricht ($w = 0,9$); während in den übrigen Experimenten (mit unmethylierten oder hemimethylierten ndDNAs) w im Mittel bei 0,6 liegt (siehe Tabelle 7). Die Werte für die Fehlpaarung in Codon 16 schwanken zwar stark um diesen Mittelwert, doch ist aus Arbeiten von FAZAKERLEY *et al.*, 1986, JONES *et al.*, 1987 b, und eigenen Untersuchungen (Abschnitt 3.6.3.) bekannt, daß die Erkennung von Fehlpaarungen durch das methylierungsabhängige System unterschiedlich ist und stark von der Sequenzumgebung abhängt; dies könnte auch für das VSP-System zutreffen. Außerdem könnte die T/G-Fehlpaarung in Codon 23 nicht der ideale Referenzpunkt für Vergleiche mit anderen Fehlpaarungen sein. Dennoch läßt sich allgemein sagen, daß *erstens* bei fehlender methylierungsinstruierter *mismatch*-Reparatur 90 % aller ndDNAs durch das VSP-System korrigiert werden,

Tabelle 7: Die Konkurrenz zwischen VSP-Reparatur und anderen DNA-mismatch-Reparatursystemen in *E. coli*

T/G (G/T)-Fehlpaarung in								
Stamma	Zustand der Adenin- methylierung	Codon 23		Codon 4,3 (Set I)		Codon 16 (Set II)	$\bar{w}$	
		(-)Strangmarkerausbeute ^b		(-)Strangmarkerausbeute ^c				(-)Strangmarkerausbeute ^c
		(+)-Strang/ (-)-Strang	nach Reinfektion	nach Reinfektion	nach Reinfektion			
<i>mutH</i>	me+/me+		74 %	98 %	(0,9)	11 %	(0,9)	0,9
	me-/me+		73 %	97 %	(0,9)	10 %	(0,9)	
	me+/me-		73 %	95 %	(0,8)	9 %	(0,9)	
	me-/me-		74 %	96 %	(0,9)	7 %	(0,9)	
Wildtyp	me+/me+		78 %	98 %	(0,9)	9 %	(0,9)	0,6 ^d
	me-/me+		90 %	98 %	(0,8)	52 %	(0,4)	
	me+/me-		30 %	71 %	(0,6)	7 %	(0,8)	
	me-/me-		51 %	87 %	(0,7)	34 %	(0,3)	

Die mathematische Simulation der Konkurrenz verschiedener DNA-mismatch-Reparaturwege um dieselbe Fehlpaarung ist im Text beschrieben. Die Werte für den Wahrscheinlichkeitsfaktor w (in Klammern) geben die Wahrscheinlichkeit an, mit der die Fehlpaarung durch das VSP-System korrigiert wird.

^a BMH 71-18 und BMH 71-18 μmutH für die Experimente mit den Fehlpaarungen in Codon 16 (Set II) und 23, WK-6 und WK-6 μmutH für Experimente mit der Fehlpaarung in Codon 4,3 (Set I)

^b Daten aus B. KRAMER, 1986

^c Daten aus den Tabellen 5 und 6

^d Mittelwert der berechneten Wahrscheinlichkeitsfaktoren aus den sechs Experimenten mit hemimethylierten oder unmethylierten ndDNAs von Set I und Set II

und *zweitens* in den Fällen, in denen zwei oder mehr Reparatursysteme um ihr Substrat konkurrieren, das VSP-System ein- bis zweimal effizienter ist.

Tabelle 8: *dcm*-Abhängigkeit der VSP-Reparatur

Zustand der Adenin-methylierung	(-)Strangmarkerausbeuten nach Reinfektion		
	Set I (T/G, Codon 4.3)		Set II (G/T, Codon 16)
(+)Strang/ (-)Strang	RHZ 2-2	RP4182	RHZ 1-2
me+/me+	96 % (2/0)	90 % (1/-)	35 % (3/5)
me-/me+	99 % (2/1)	91 % (1/-)	89 % (3/4)
me+/me-	36 % (2/3)	27 % (1/-)	20 % (3/3)
me-/me-	70 % (2/3)	47 % (1/-)	67 % (3/3)

Die Durchschnittswerte wurden ermittelt und dargestellt wie in der Legende zu Tabelle 5 angegeben. Als Reinfektionswirte wurden die Wildtypstämme WK-6 für die ndDNAs von Set I und BMH 71-18 für Set II verwendet.

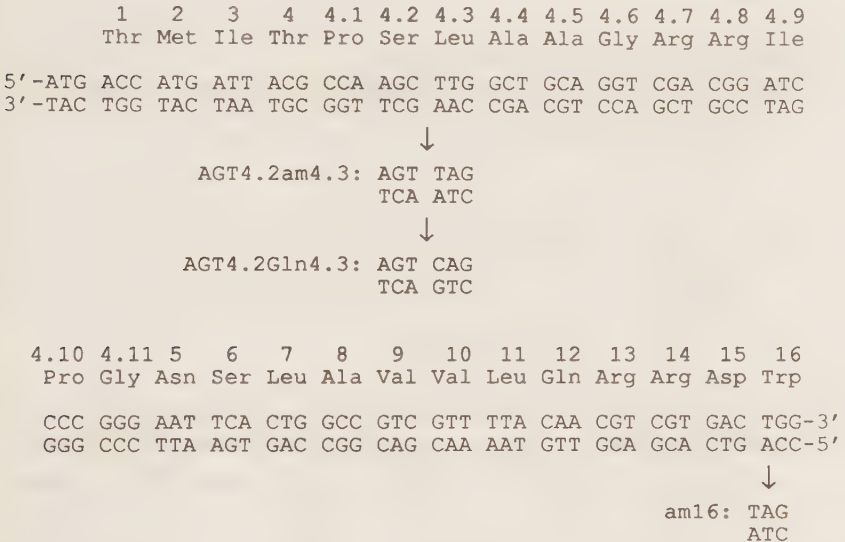
3.5. Experimente zur Substraterkennung

Nachdem im vorangegangenen Abschnitt gezeigt wurde, daß die VSP-Reparatur ein hoch-effizienter Prozeß ist, ergibt sich die Frage, wie bestimmte T/G-Fehlpaarungen als Substrate dieses Reparatursystems erkannt werden und welche Faktoren an diesem Erkennungsprozeß beteiligt sind. Als Signale könnten der Kontext der *dcm*-Sequenz und/oder der der Fehlpaarung benachbarte 5-Methyl-Cytosinrest sein (siehe Figur 1).

Bei Verwendung von *dcm*-Stämmen als Transfektionswirte läßt sich eine direkte Beteiligung der Dcm-Methyltransferase prüfen, das ja das einzige bekannte *E. coli*-K-Protein mit natürlicher Affinität zu CCA/TGG-Sequenzen ist. Durch Variation des Sequenzkontexts der Fehlpaarung und der Cytosin-Methylierung in den zur Transfektion verwendeten Heteroduplex-DNAs lassen sich Fragen zur Substraterkennung untersuchen.

Zunächst wurde die Beteiligung der Dcm-Methyltransferase an der VSP-Reparatur durch Transfektion von *dcm*-6-Stämmen (RHZ 1-2, RHZ 2-2) bzw. eines Δ *dcm*-Stammes (RP4182) mit den in Abschnitt 3.2. beschriebenen Heteroduplex-

DNAs getestet. Das Ergebnis zeigt Tabelle 8. Der Vergleich mit den Werten der Tabelle 5 zeigt den Einfluß des *dcm*-Hintergrunds. Die (-)Strangmarkerausbeuten erreichen fast die Werte der normalen T/G-Fehlpaarung in Codon 23. Eine Ausnahme stellen die vollmethylierten ndDNAs dar, die noch deutlich durch das VSP-System korrigiert werden. Hier ist die Konkurrenz mit anderen Reparatursystemen am kleinsten. Dieses Ergebnis wird weiter unten ausführlich diskutiert.



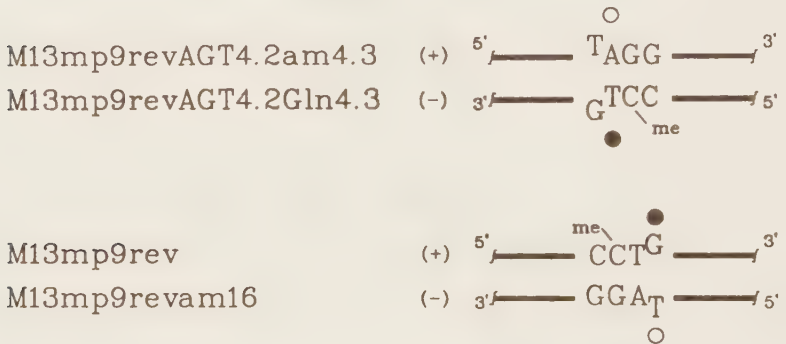
Figur 5: Mutationen in der N-terminalen Region des *lacZ*-Genfragmentes von M13mp9rev-Phagen zur Untersuchung der VSP-Reparatur von T/G-Fehlpaarungen in *dcm*-ähnlichem Sequenzkontext.

Zur Codon-Nummerierung siehe Legende zu Figur 3. Die Bezeichnung "AGT4.2" soll eine konservative (d. h. phänotypisch nicht in Erscheinung tretende) Mutation im Codon 4.2 zum Ausdruck bringen. Die Mutation *lacZ*am16 ist in KRAMER *et al.*, 1982, beschrieben. Zur Konstruktion der übrigen Mutationen siehe den Abschnitt "Experimenteller Teil".

Der Einfluß der Cytosin-Methylierung wurde durch Variation des unmittelbaren Sequenzkontexts um die Fehlpaarung untersucht. LIEB *et al.*, 1986, haben gezeigt, daß G/T-Fehlpaarungen in CA/TGG- oder CCA/TG-Sequenzen ebenfalls VSP-Reparatur initiieren. Eine Studie von LEONG *et al.*, 1987, demonstriert die biologische Relevanz dieser Ergebnisse: Die signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit von Transitionsmutationen im *lacI*-Gen der untersuchten *mutH,S,U*-Stämme lassen sich durch VSP-Reparatur auch in *dcm*-ähnlichen Sequenzen erklären. Auch RAPOSA and Fox, 1987, beschreiben VSP-Reparatur in solchen

Sequenzabschnitten. Die *dcm*-ähnlichen Sequenzen werden von der Dcm-Methyltransferase nicht modifiziert; Cytosin-Methylierung kann also für die Substraterkennung keine strikte Voraussetzung sein.

Durch einen konservativen Austausch in Codon 4.2 der Phagen M13mp9revGln4.3 und M13mp9revam4.3 wurde die *dcm*-Sequenz in diesem Abschnitt so verändert, daß er vom Dcm-Protein zwar nicht mehr methyliert, aber zur Konstruktion von Heteroduplex-DNAs mit einer "repair prone"-Fehlpaarung verwendet werden kann (siehe Figur 5); für die G/T-Fehlpaarung in Codon 16 war keine Mutagenese notwendig, weil hier der Wildtyp M13mp9rev und die beschriebene Mutante M13mp9revam16 (KRAMER *et al.*, 1984 b) benutzt werden konnten. In Figur 6 sind die Heteroduplex-DNAs dargestellt; das Ergebnis der Transfektionsexperimente zeigt Tabelle 9.



Figur 6: Heteroduplex-DNA-Moleküle mit definierten T/G-Fehlpaarungen in *dcm*-ähnlichem Sequenzkontext.

Die obere ndDNA wurde aus Einzelstrang-DNA des Phagen M13mp9revAGT4.2am4.3 und linearisierter RF-DNA des Phagen M13mp9revAGT4.2Gln4.3 hergestellt. Für die untere ndDNA wurde RF-DNA von M13mp9revam16 an ssDNA des Genoms von M13mp9rev (Wildtyp) hybridisiert. Die offenen und gefüllten Kreise bezeichnen Codons, die einen farblosen oder blauen Plauephänotyp verursachen.

Im Wildtyp-Stamm hat die Variation der DNA-Sequenz einen deutlichen Effekt auf die Reparierbarkeit der T/G-Fehlpaarung. Der Einfluß der methylierungsabhängigen Reparatur wird stärker; offensichtlich ist hier die Konkurrenzfähigkeit der VSP-Reparatur vermindert. Dies trifft aber nicht für die vollmethylierte ndDNA mit der Fehlpaarung in Codon 4.3 zu. Auch im *mutH*-Hintergrund, wo dieselbe Konkurrenzsituation vorliegt, ist die VSP-Reparatur weiterhin dominierend. Für die ndDNAs mit der G/T-Fehlpaarung in Codon 16 ist die Ausbeute im *mutH*-Stamm ebenfalls noch deutlich zugunsten des (+)Strangs

Tabelle 9: VSP-Reparatur in *dcm*-ähnlichem Sequenzkontext

<i>dcm</i> -ähnlicher Sequenzkontext in Codon	Zustand der Adenin- methylierung	(-)Strangmarkerausbeute							
		Wildtyp		<i>muth</i>		<i>dcm-6</i>			
		nach Transfektion	nach Reinfektion	nach Transfektion	nach Reinfektion	nach Transfektion	nach Reinfektion	nach Transfektion	nach Reinfektion
4,3 (T/G)	me+/me+	94 % (3/0)	94 % (3/2)	95 % (2/0)	94 % (2/1)	90 % (3/2)			
	me-/me+	95 % (3/0)	97 % (3/1)	93 % (2/0)	93 % (2/1)	95 % (3/1)			
	me+/me-	48 % (3/7)	45 % (3/11)	94 % (2/1)	94 % (2/1)	26 % (3/3)			
	me-/me-	73 % (3/6)	66 % (3/6)	93 % (2/0)	93 % (2/1)	53 % (3/2)			
16 (G/T)	me+/me+	43 % (3/5)	55 % (3/4)	30 % (2/2)	31 % (2/2)	79 % (3/2)			
	me-/me+	61 % (3/5)	81 % (3/3)	28 % (2/4)	32 % (2/2)	94 % (3/1)			
	me+/me-	21 % (3/3)	21 % (3/4)	33 % (2/2)	34 % (2/3)	20 % (3/3)			
	me-/me-	40 % (3/6)	47 % (3/1)	31 % (2/2)	27 % (2/5)	46 % (3/2)			

Die Durchschnittswerte wurden ermittelt und dargestellt wie in der Legende zu Tabelle 5 angegeben. Für die ndDNAs mit der T/G-Fehlpaarung in Codon 4,3 wurden die Stämme WK-6, WK-6*muth* und RHZ 1-2 als Transfektionswirte verwendet, für die ndDNAs mit der G/T-Fehlpaarung in Codon 16 die Stämme BMH 71-18, BMH 71-18*muth* und RHZ 1-2. Als Reinfektionswirte dienten die entsprechenden Wildtypstämme. Der Sequenzkontext ist in der Figur 5, die Heteroduplex-DNAs sind in Figur 6 dargestellt.

verschoben, ist aber nicht mehr so stark ausgeprägt. Im *dcm*-Hintergrund ist VSP-Reparatur praktisch nicht mehr nachweisbar: mit Ausnahme der vollmethylierten ndDNA mit der T/G-Fehlpaarung in Codon 4.3, die immer noch eine starke (-)Strangbevorzugung aufweist, führt die Transfektion der übrigen ndDNAs zu normalen (-)Strangmarkerausbeuten (vergleiche mit Tabelle 5; T/G-Fehlpaarung in Codon 23).

Im Abschnitt 3.4. wurde gezeigt, daß die Konkurrenz zwischen VSP-Reparatur und methylierungsabhängiger Reparatur am größten ist, wenn die Heteroduplex-DNAs an den GATC-Sequenzen hemimethyliert sind und sich die intakte *dcm*-Sequenz auf dem Adenin-unmethylierten DNA-Strang befindet. In solchen ndDNAs arbeiten die beiden Reparatursysteme mit entgegengesetzter Strangbevorzugung und Effekte, die die Effizienz der Reparatur in die eine oder andere Richtung beeinflussen, werden vergrößert. Solche Heteroduplex-DNAs wurden aus der DNA von Phagen präpariert, die in *dcm*-6-Stämmen vermehrt worden waren und daher an den Cytosinen unmethyliert waren.

Tabelle 10 zeigt das Ergebnis der Transfektionsexperimente mit diesen Heteroduplex-DNAs; zum besseren Vergleich enthält sie auch einzelne Werte aus den Tabellen 5, 6, 8 und 9. Als Transfektionswirte wurden neben den Wildtypstämmen (WK-6, BMH 71-18) und ihren *mutH*-Derivaten auch *dcm*-6-Stämme (RHZ 1-2, RHZ 2-2) verwendet.

Für die T/G-Fehlpaarung in Codon 4.3 ist der Einfluß der 5-Methylgruppe in der intakten *dcm*-Sequenz des Matrizenstrangs deutlich zu erkennen. Hier sinkt die (-)Strangmarkerausbeute von 71 % nach der Reinfektion auf 47 %. Verglichen mit der Ausbeute an (-)Strangmarker, die eine hemimethylierte ndDNA mit normaler T/G-Fehlpaarung liefert (30 %; siehe Tabelle 5), ist der Wert immer noch sehr hoch, entspricht aber dem Wert, den die hemimethylierte ndDNA mit T/G-Fehlpaarung in *dcm*-ähnlichem Sequenzkontext liefert (43 %). Daraus läßt sich schließen, daß für Codon 4.3 der unmittelbare Sequenzkontext zur Fehlpaarung, die *dcm*-Sequenz, mindestens aber eine *dcm*-ähnliche Sequenz, für die Erkennung ausreicht; die 5-Methylgruppe am Cytosinrest übt hier nur einen zusätzlichen Effekt auf die Reparaturreffizienz aus.

Dieser zusätzliche Effekt läßt sich an der G/T-Fehlpaarung in Codon 16 nicht zeigen. Hier ist nicht auszuschließen, daß der Wert für die Transfektion des Wildtyps mit der Cytosin-methylierten ndDNA mit 52 % (siehe die Tabellen 5 und 10) zu hoch ermittelt wurde. Bei der Berechnung des Wahrscheinlichkeitsfaktors w (siehe Abschnitt 3.4.) ergab sich nämlich der niedrige Wert von nur 0,4. Die 40 %-Markerausbeute für die Cytosin-unmethylierte ndDNA, die auf eine scheinbar stärkere VSP-Reparatur hinweist, ist daher als qualitativ gleiches Ergebnis zu der

52 % (-)Strangmarkerausbeute im Wildtyp anzusehen. Signifikant ist der Anstieg auf 81 % bei einer ndDNA mit *dcm*-ähnlicher Sequenz in den Codons 15/16. Ebenfalls ein drastischer Anstieg ist im *mutH*-Hintergrund zu verzeichnen. Bei Abwesenheit störender Konkurrenz sorgt eine Variation der Cytosin-Methylierung nicht für eine Änderung in der Reparatur-Effizienz, wohl aber die Änderung der DNA-Sequenz. Hier zeigt sich wie wichtig die intakte *dcm*-Sequenz für die Erkennung dieser Fehlpaarung ist.

Tabelle 10: Abhängigkeit der VSP-Reparatur von Cytosin-Methylierung und *dcm*-Sequenz

Fehlpaarung in Codon	Adenin- methylierung	Fehlpaarung und Sequenz- kontext	(-)Strangmarkerausbeute nach Reinf.		
			Transfektionswirt:		
			Wildtyp	<i>dcm</i> -6	<i>mutH</i>
4.3	me ⁺ /me ⁻	CTAG G GGTC*C	71 % (8/14)	36 % (2/3)	98 % (4/1)
		CTAGG GGTCC	47 % (3/7)	14 % (2/3)	93 % (2/5)
		TAGG GTCC	45 % (3/11)	26 % (3/3)	94 % (2/1)
16	me ⁻ /me ⁺	C*CTGG G GTTC	52 % (3/5)	89 % (3/4)	11 % (2/1)
		CCTGG GGA TC	40 % (3/6)	77 % (3/3)	7 % (2/1)
		CTGG GATC	81 % (3/3)	94 % (3/1)	32 % (2/2)

Die Durchschnittswerte sind den Tabellen 5, 6, 8 und 9 entnommen; sie wurden ermittelt und dargestellt wie in der Legende zu Tabelle 5 angegeben. Das Zeichen * symbolisiert die 5-Methylgruppe am internen Cytosinrest der *dcm*-Sequenz. Die ndDNAs mit Fehlpaarung in Codon 4.3 wurden zur Transfektion von WK-6, WK-6*mutH* und RHZ 1-2 bzw. RHZ 2-2 verwendet; BMH 71-18, BMH 71-18*mutH* und RHZ 1-2 als Transfektionswirte wurden für die Transfektionsexperimente mit den ndDNAs mit der Fehlpaarung in Codon 16 verwendet. Als Reinfektionswirte wurden die Wildtypstämme WK-6 und BMH 71-18 benutzt.

Das unterschiedliche Verhalten der beiden Fehlpaarungen in Codon 4.3 und Codon 16 könnte folgende Ursache haben:

Codon 4.3: Die Cytosin-Methylierung hat auf die Reparierbarkeit der

T/G-Fehlpaarung einen starken Einfluß, indem es die Konkurrenzfähigkeit des VSP-Systems verbessert, möglicherweise durch Erhöhung der Geschwindigkeit, mit der das Substrat erkannt wird. Fällt die Konkurrenz weg (bei Verwendung vollmethylierter ndDNAs zur Transfektion oder Transfektion von *mutH*-Stämmen), lassen sich auch Beeinträchtigungen im Erkennungssystem hinnehmen (hier: eine Mutation im *dcm*-Gen, Cytosin-unmethylierte *dcm*-Sequenz oder Wegfall der Cytosin-Methylierung durch Abänderung der DNA-Sequenz): die Ausbeuten liegen jeweils über 90 %.

Codon 16: Hier hat die Cytosin-Methylierung nur einen geringen Einfluß auf die Reparierbarkeit der Fehlpaarung: Cytosin-methylierte und Cytosin-unmethylierte ndDNAs werden im Wildtyp- und *mutH*-Stämmen jeweils mit der gleichen Effizienz repariert. Wesentlich für die Erkennung ist das Vorhandensein einer intakten *dcm*-Sequenz. Eine Änderung in dieser Sequenz bewirkt in beiden Stämmen eine starke Verringerung der Reparatur-Effizienz [d. h. Anstieg der (-)Strangmarkerausbeuten].

Eine ähnlich unterschiedliche Reparierbarkeit von T/G-Fehlpaarungen im Bereich der CCAG-Sequenzen der λ -Mutationen *Pam3* und *Pam80* wurde auch von RAPOSA and FOX, 1987, beobachtet.

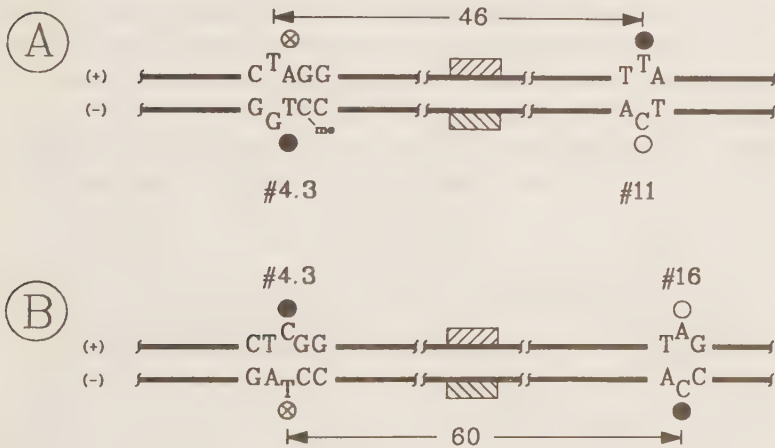
Die Transfektion von *dcm*-Stämmen mit den oben beschriebenen Heteroduplex-DNAs offenbart die direkte Beteiligung des Dcm-Proteins an der VSP-Reparatur sowohl bei Cytosin-methylierten wie auch Cytosin-unmethylierten ndDNAs. Neben seiner Aktivität als Methyltransferase hat das *dcm*-Genprodukt demnach eine weitere Funktion, möglicherweise als Erkennungsfaktor. Ein bemerkenswerter Effekt ergibt sich beim Vergleich der *dcm*-Stämme: während die *dcm-6*-Stämme RHZ 1-2 und RHZ 2-2 noch eine restliche VSP-Reparatur-Aktivität haben (wahrscheinlich beruhen hierauf auch die Schwankungen in den Markerausbeuten, die in Tabelle 10 dargestellt sind), ist diese im Δdcm -Stamm RP4182 völlig verschwunden. Dies zeigt sich besonders gut in den weiter unten beschriebenen Doppelmarker-Experimenten (siehe Abschnitt 3.6.3. und Tabelle 10). Dieser Effekt macht das Dcm-6-Protein zu einem interessanten Studienobjekt: einerseits hat es durch eine Mutation seine nachweisbare Methyltransferase-Aktivität verloren, andererseits erlaubt es noch VSP-Reparatur, wenn auch mit stark verringerter Effizienz.

3.6. Untersuchungen zur Traktlänge der VSP-Reparatur

Charakteristische Traktlängen der DNA-Neusynthese sind ein Kriterium zur Unterscheidung verschiedener DNA-Reparatursysteme (siehe dazu FRIEDBERG, 1984). Die Reparaturtraktlängen der methylierungsabhängigen DNA-*mismatch*-Reparatur wurden von WAGNER and MESELSON, 1976, bestimmt und mit ca. 3000 Nukleotide angegeben. Für das VSP-System wurden von LIEB, 1983, extrem kurze Traktlängen

postuliert: in Vierfaktorkreuzungen mit *clam6* konnte sie entkoppelte Reparatur beobachten, wenn die beiden betrachteten Marker im *cl*-Gen nur sechs Nukleotide voneinander entfernt waren. Da sie andererseits immer Co-Reparatur beobachtete, wenn der zweite Marker drei Nukleotide entfernt war, schloß sie, daß die Traktlänge der VSP-Reparatur größer als drei, aber kleiner als sechs Nukleotide sei.

Die Frage nach der Traktlänge der VSP-Reparatur im M13-System wurde durch Markerentkopplungsexperimente mit Heteroduplex-DNA-Molekülen untersucht, wie sie in Figur 7 A dargestellt sind.



Figur 7: Heteroduplex-DNA-Moleküle mit zwei definierten Base/Base-Fehlpaarungen zur Untersuchung von DNA-Reparatur-Traktlängen.

Zur Codon-Nummerierung und DNA-Sequenzumgebung siehe auch Figur 8. Die 5'→3'-Polarität der oberen DNA-Stränge verläuft von links nach rechts. Die Pfeile geben die Distanz zwischen den Fehlpaarungen an. Die schraffierten Flächen in der Mitte der Zeichnungen symbolisieren verschiedene Methylierungszustände der GATC-Sequenz in den Codons 4.8/4.9. Gefüllte Kreise bezeichnen Sinn-Codons, schraffierte Kreise in BMH 71-18 suppressierbare Stop-Codons und offene Kreise in BMH 71-18 nicht suppressierbare Stop-Codons. Die obere Heteroduplex-DNA (A) wurde aus dem (+)Strang des Phagen M13mp9revam4.3 und dem (-)Strang des M13mp9revGln4.3op11-Genoms zur Untersuchung der Traktlänge der VSP-Reparatur konstruiert. Die untere Heteroduplex-DNA (B) wurde für ein Kontrollexperiment benötigt und durch Hybridisierung des (-)Stranges von M13mp9revam4.3 an den (+)Strang von M13mp9revSer4.3am16 hergestellt. Nicht-Reparatur oder Reparatur mit großen Traktlängen führt zu Phagen mit farblosem Plaquephänotyp in *Sur*-Stämmen. Unterscheiden lassen sich die Nachkommen der Ausgangs-DNAs durch Suppression des *amber4.3*-Codons (schraffierte Kreise) in BMH 71-18. Nur entkoppelte Reparatur kann zu Phagen mit blauem Plaquephänotyp in *Sur*-Stämmen führen.

3.6.1. Doppelmarker-Experimente zur Untersuchung von DNA-Synthese-Traktlängen

Grundsätzlich müssen Markerentkopplungsexperimente so geplant sein, daß sich die Reparatur der beteiligten Fehlpaarungen verfolgen und die Plaquephänotypen der Ausgangs-DNAs und gegebenenfalls der reparierten DNAs unterscheiden lassen. Dies wird im M13-System durch folgende Eigenschaften ermöglicht:

Erstens: Die hier beschriebenen Heteroduplex-DNA-Moleküle enthalten neben der untersuchten (sog. *repair prone*-Fehlpaarung) noch eine zweite Fehlpaarung, die jedoch nicht durch das methylierungsabhängige und das VSP-System reparierbar ist. Dadurch wird sichergestellt, daß die Ergebnisse, die die untersuchten Fehlpaarungen liefern, nicht durch zusätzliche von der zweiten Fehlpaarung initiierte Reparaturereignisse verfälscht und quantitative Aussagen unmöglich gemacht werden.

Zweitens: Der farblose Plaquephänotyp der beiden Ausgangs-DNAs wird durch Stop-Codons im *lacZ*- α -Genfragment der M13mp9rev-Phagen bestimmt. Nur einige *amber*-Codons lassen sich in BMH 71-18-Wirtsstämmen supprimieren (z. B. *lacZam4.3*). Dies erlaubt die Unterscheidung der Ausgangs-DNAs und damit Aussagen über Richtung und Ausmaß der Reparatur von Fehlpaarungen in Heteroduplex-DNAs.

Drittens: Fehlende Reparatur und passive Co-Reparatur der zweiten Fehlpaarung (Reparatur mit DNA-Synthese, deren Traktlänge größer als die Distanz zur zweiten Fehlpaarung ist; sog. *long patch*-Reparatur) führen zu Phagen mit farblosem Plaquephänotyp in WK-6; beide Ereignisse lassen sich anhand ihrer charakteristischen Markerverteilung erkennen, die durch Suppression des *amber*-Codons ermittelt werden kann.

Viertens: Nur lokalisierte Reparatur kann zu rekombinanten Phagen mit blauem Plaquephänotyp in WK-6 als Plattierkultur führen. Nach der Transfektion sind dabei sektorierte Plaques zu beobachten, die im Reinfektionsschritt in reine farblose und blaue Plaques segregieren.

Daß das M13-System diese Bedingungen erfüllen kann, soll zunächst an einem Kontrolllexperiment demonstriert werden. In Figur 7 B ist eine Heteroduplex-DNA gezeigt, die in Codon 4.3 eine nicht reparierbare C/T-Fehlpaarung besitzt. 60 Nukleotide in promotordistaler Richtung im *lacZ*-Gen liegt eine A/C-Fehlpaarung (in Codon 16); sie hatte sich in früheren Experimenten als reparierbar erwiesen (KRAMER *et al.*, 1982). Zwischen beiden Fehlpaarungen liegt eine Dam-Methyltransferase-Erkennungssequenz (Codons 4.8/4.9). Die Heteroduplex-DNAs wurden durch Hybridisierung von einzelsträngiger M13mp9revSer4.3am16-DNA an

linearisierter M13mp9revam4.3-RF-DNA konstruiert. Die Ergebnisse der Transfektionsexperimente mit den beiden entgegengesetzt hemimethylierten ndDNAs dieses Typs sind in Tabelle 11 dargestellt.

Nach Transfektion von BMH 71-18 ist deutlich die methylierungsinstruierte Reparatur zu sehen: als Matrize für die DNA-Neusynthese wird der methylierte DNA-Strang bevorzugt. Dabei wird der blaue Plaquephänotyp durch Suppression hervorgerufen, wie der Vergleich der Werte aus Reinfektion in WK-6 bzw. BMH 71-18 zeigt. Weniger als 1 % aller Plaques zeigen blauen Phänotyp in WK-6 als Reinfektionswirt, was durch entkoppelte Reparatur oder Kontamination erklärt werden kann. Das Gros aller Reparaturereignisse führt zu passiver Co-Reparatur der C/T-Fehlpaarung. Bei Reparatur mit dem (+)Strang als Matrize läßt sich die Co-Reparatur durch Sequenzierung eindeutig zeigen: von 20 farblosen Klonen, die nach Reinfektion in BMH 71-18 zufällig gepickt wurden, waren alle vom (+)Strang-Genotyp (Sequenzdaten nicht gezeigt). Bei Reparatur mit dem (-)Strang als Matrize zeigen 90 % der Nachkommen den (+)Strang-codierten Plaquephänotyp; nur etwa 2 % entkoppelte Reparatur ist nach der Transfektion nachweisbar.

Tabelle 11: Doppelmarkerexperimente mit Heteroduplex-DNAs, die zwei Fehlpaarungen enthalten: die Reparatur einer C/A-Fehlpaarung in Codon 16 und passive Co-Reparatur

Zustand der Adenin- methylierung	Transfektions- wirt	Ausbeute an Phagen mit blauem Plaquephänotyp		
		nach Transfektion	nach Reinfektion in WK-6	nach Reinfektion in BMH 71-18
(+)Strang/ (-)Strang	WK-6	<1 % (2/0)	<1 % (2/0)	19 % (2/7)
	BMH 71-18	28 % (2/2)	<1 % (2/0)	19 % (2/2)
me-/me+	WK-6	2 % (2/0)	<1 % (2/0)	90 % (2/1)
	BMH 71-18	88 % (2/2)	<1 % (2/0)	90 % (2/0)

Die Durchschnittswerte wurden ermittelt und dargestellt wie in der Legende von Tabelle 5 angegeben. Meßwerte zwischen 0,4 und 0,9 % (mit maximalen Abweichungen von 0,3 %) wurden <1 % gesetzt.

Dieses Ergebnis läßt sich wie folgt interpretieren:

LÄNGLE-ROUAULT *et al.*, 1987, haben aus ihren Ergebnissen zur Reparatur von Fehlpaarungen im Phagen ϕ X174 ein Modell zum Mechanismus der *mismatch*-Reparatur entwickelt, in dem Helicase II nach Stimulation durch die Fehlpaarung den

DNA-Doppelstrang aufschmilzt. Die entstehenden DNA-Einzelstränge werden durch *ssb*-Protein stabilisiert, um ein Renaturieren zu verhindern. Diese Reaktion wird an Einzelstrangbrüchen beendet, die entweder zufällig in der DNA vorhanden sind oder durch das MutH-Protein spezifisch an unmethylierten GATC-Sequenzen (*dam*-Sequenzen) erzeugt werden (LU *et al.*, 1984; WELSH *et al.*, 1987). Dadurch fällt einer der beiden DNA-Stränge heraus; der entstandene *gap* wird durch eine DNA-Polymerase aufgefüllt und anschließend durch die DNA-Ligase geschlossen. Dieses Modell ist in der Lage, sowohl die Eigenschaften der methylierungsinstruierten als auch der methylierungsunabhängigen Reparatur zu erklären. Wenn nicht an allen *dam*-Sequenzen Einzelstrangbrüche erzeugt werden (z. B. weil die intrazelluläre MutH-Aktivität nicht ausreicht, die DNA an allen unmethylierten GATC-Sequenzen zu schneiden, oder weil es Substrate gibt, die sehr viel langsamer geschnitten werden als andere) können Traktlängen beobachtet werden, die größer sind als die Distanz zwischen den beiden der Fehlpaarung benachbarten *dam*-Sequenzen. Die von WAGNER und MESELSON, 1976, bestimmte durchschnittliche Traktlänge der DNA-Neusynthese ist mit ca. 3000 Nukleotiden deutlich größer als nach der statistischen Häufigkeit der GATC-Sequenzen zu erwarten wäre. Auch die GATC-Sequenz in den Codons 4.8/4.9 des *lacZ*-Gens von M13mp9rev-Phagen könnte eine Sequenz sein, an der es seltener zu Incisionen durch das MutH-Protein kommt. Dies führt in den Heteroduplex-DNA-Molekülen wie sie in Figur 7 dargestellt sind zur beobachteten Co-Reparatur (vergl. auch Figur 11 und die Ergebnisse in Abschnitt 3.7.).

Eine andere Erklärung für die Co-Reparatur ist, daß die *mismatch*-Reparatur durch eine Nukleotidexcision eingeleitet wird, die am Einzelstrangbruch neben der GATC-Sequenz in Codon 4.8/4.9 beginnt. Die dafür benötigte Exonuklease ist zwar nicht identifiziert, es ist aber nicht auszuschließen, daß der bestehende *nick* zunächst durch eine *gap*-Öffnung (durch eine 5'→3'-gerichtete Exonuklease-Aktivität) verbreitert wird. Dort, wo diese Reaktion nicht über das Codon 4.3 hinausgeht, kommt es zu entkoppelter Reparatur. Zur Zeit läßt sich nicht zwischen beiden Hypothesen entscheiden.

Angemerkt sei noch, daß die Transfektion von WK-6 und BMH 71-18 mit denselben ndDNAs zu identischen Markerausbeuten führt, was die Annahme stützt, daß sich beide Stämme in ihrer Reparaturprofizienz nicht unterscheiden.

3.6.2. Nachweis entkoppelter Reparatur durch das VSP-System

Zum Nachweis entkoppelter Reparatur wurde die Einzelstrang-DNA von M13mp9revam4.3 gegen linearisierte RF-DNA der Doppelmutante M13m9revGln4.3op11 hybridisiert (siehe Figur 7 A und Figur 8). Dies ergibt eine ndDNA mit einer T/G-Fehlpaarung (in Codon 4.3) im Kontext der

dcm-Erkennungssequenz und eine nicht-reparierbare T/C-Fehlpaarung in Codon 11 (46 Nukleotide in promotordistaler Richtung im *lacZ*-Gen). In dieser Heteroduplex-DNA liefert nur lokalisierte Reparatur in Codon 4.3, die zum Erhalt der *dcm*-Sequenz führt, sektorierte Plaques mit rekombinanten Phagen, während fehlende Reparatur, lokalisierte Reparatur gegen die *dcm*-Sequenz oder passive Co-Reparatur der Fehlpaarung in Codon 11 zu farblosen Plaques führt. Das Ergebnis der Transfektionsexperimente ist in Tabelle 12 zusammengestellt.

Der linke Teil der Tabelle enthält die Daten aus Transfektions- und Reinfektionsexperimenten mit WK-6 und seinen *mut*-Derivaten, zeigt also direkt die entkoppelte Reparatur. Im *mutH*-Hintergrund, wo keine methylierungsabhängige Reparatur stattfindet, sodaß ca. 90 % aller transfizierenden ndDNAs durch das VSP-System korrigiert werden (siehe Abschnitte 3.2. und 3.4.), werden 25 % aller ndDNAs entkoppelt repariert (Minimalabschätzung, s. u.). Wegen der asymmetrisch verlaufenden *rolling circle*-Replikation von M13-Phagen (KORNBERG, 1980) wird der Anteil blauer Plaques bei der Reinfektion deutlich vermindert.

Im Wildtyp-Stamm zeigt sich der Einfluß der konkurrierenden methylierungsabhängigen Reparatur durch eine Verringerung der Ausbeute an Phagen mit blauem Plaquephänotyp.

Im *mutS*- und *mutL*-Hintergrund geht die entkoppelte Reparatur noch stärker zurück (6 - 8 % blaue Plaques); dies ist ein Hinweis auf die in Abschnitt 3.2. schon beobachtete Abhängigkeit der VSP-Reparatur von diesen Loci. Diese Abhängigkeit ist aber nicht strikt.

Es gibt folgende Erklärungen für den Anteil von 75 % farbloser Plaques bei der Transfektion in WK-6*mutH* bzw. den noch höheren Anteil im Wildtyp-Stamm: 1. fehlende Reparatur, 2. entkoppelte Reparatur der T/G-Fehlpaarung in Codon 4.3 mit dem Thyminrest im Matrizenstrang, 3. *long patch*-Reparatur durch ein konkurrierendes Reparatursystem und 4. Reparaturtrakte der VSP-Reparatur, die eine Länge von 45 Nukleotiden überschreiten.

Durch Suppression lassen sich die Nachkommen des (+)Strangs phänotypisch erkennen, sodaß es möglich wird, zwischen den oben genannten Möglichkeiten zu entscheiden. Der rechte Teil der Tabelle 12 enthält die Ergebnisse der Experimente, bei denen der Suppressorstamm BMH 71-18 und seine *mut*-Derivate als Transfektionswirte bzw. Plattierkultur verwendet wurden.

Fehlende Reparatur kann leicht ausgeschlossen werden, wie der Vergleich der vier verwendeten BMH 71-18-Stämme zeigt. Die Reparatur-defizienten *mutS*- und *mutL*-Stämme unterscheiden sich deutlich von BMH 71-18 und BMH 71-18*mutH* und liefern ähnliche Ausbeuten an (+)Strangmarker wie die Experimente mit der T/G-Einzelfehlpaarung (siehe dazu auch Tabelle 6). Auch entkoppelte Reparatur der Fehlpaarung in Codon 4.3 mit Excision des Purins trägt nicht wesentlich zum Anteil

der Phagen mit farblosem Plaquephänotyp bei. Die im Abschnitt 3.6.1. beschriebenen Doppelmarkerexperimente zeigen, daß bei der Reparatur der Heteroduplex-DNA, die in Figur 7 B dargestellt ist, die hemimethylierte Form me^-/me^+ etwa 2 % rekombinante Phagen nach der Transfektion liefert. Die analoge Situation liegt bei der ndDNA mit T/G-T/C-Doppelfehlpaarung in der hemimethylierten Form me^+/me^- vor. Hier könnten etwa 2 % Phagen mit dem Genotyp M13mp9revam4.3op11 vorliegen, bei allen anderen ndDNAs werden weniger rekombinante Phagen erwartet. Die farblosen Plaques müssen also durch *long patch*-Reparatur entstanden sein, die entweder durch das VSP-System oder ein konkurrierendes *mismatch*-Reparatursystem initiiert wird. Folgende Evidenz spricht für das VSP-System als wahrscheinlichen Kandidaten:

Da nicht nur rekombinante Phagen vom Genotyp M13mp9revGln4.3 einen blauen Plaquephänotyp haben, sondern auch die (+)Strang-Nachkommen bei Suppression des *amber*-Codons, führen Transfektionsexperimente mit BMH 71-18-Stämmen im Vergleich zu den WK-6-Stämmen zu einem "Überschuß" an Phagen mit blauem Plaquephänotyp. Dieser Überschuß beträgt bei Transfektion von BMH 71-18 *mutH* nur etwa 1 - 2 % im Reinfektionsschritt. Ähnlich kleine Anteile an Phagen mit dem Phänotyp des (+)Strang-kodierten Markers nach Reparatur der T/G-Fehlpaarung in Codon 4.3 wurden schon in Tabelle 6 beschrieben.

Dasselbe Resultat liefert die Transfektion des Wildtyp-Stammes. Hier schwankt der Überschuß in Abhängigkeit von der konkurrierenden methylierungsinstruierten Reparatur: me^+/me^+ 6 %, me^-/me^+ 5 %, me^+/me^- 29 % und me^-/me^- 14 %. Auch dieses Ergebnis stimmt mit der (+)Strangmarkerausbeute aus dem Experiment mit der Einzelfehlpaarung gut überein: me^+/me^+ 2 %, me^-/me^+ 2 %, me^+/me^- 29 %, me^-/me^- 13 % (siehe Tabelle 5). Erstaunlich ist, daß die WK-6- und BMH 71-18-Stämme (Wildtyp und *mutH*) nach der Transfektion so große Unterschiede im Anteil blauer Plaques aufweisen (22 % im Durchschnitt). Dieser signifikante Unterschied wurde in einer genauen Einzelplaqueanalyse bestätigt (Daten nicht gezeigt). Bei dieser Analyse wurden jeweils 110 zufällig gepickte Plaques, die aus der Transfektion von WK-6 *mutH* und BMH 71-18 *mutH* mit der hemimethylierten ndDNA me^-/me^+ resultierten, durch Reinfektion von WK-6 und BMH 71-18 auf den exakten Anteil entkoppelter Reparatur, *long patch*-Reparatur und Nicht-Reparatur getestet. Der Grund für diesen Unterschied ist nicht bekannt.

Unter der Annahme, daß sich die in Abschnitt 3.4. berechneten Konkurrenzverhältnisse nicht verändert haben, läßt sich das Ergebnis des Experiments mit der Einzelfehlpaarung in Codon 4.3 auf die Doppelmarker-Experimente wie folgt übertragen: Entkoppelte Reparatur durch das VSP-System, die zum Erhalt der *dcm*-Erkennungssequenz führt, ist experimentell nachweisbar,

allerdings werden im Gegensatz zu früheren Beobachtungen (LIEB, 1983, 1985, 1987; LIEB *et al.*, 1986; JONES *et al.*, 1987 c) nur etwa 25 % aller (in WK-6) prozessierten Heteroduplex-DNA-Moleküle mit einer Traktlänge von weniger als 46 Nukleotiden korrigiert, die restlichen Traktlängen sind größer.

Dieses unerwartete Ergebnis wirft die Frage nach der Art der Traktlängenverteilung auf. Die im folgenden Abschnitt beschriebenen Experimente sollen diese Frage beantworten.

3.6.3. Experimente zur Traktlängenverteilung

Die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Experimente haben gezeigt, daß möglicherweise nur ein Teil der durch das VSP-System initiierten Reparaturereignisse kurze Traktlängen hat. Zwei Arten von Traktlängenverteilung sind denkbar:

Erstens: Die Reparatursynthese wird an der Fehlpaarung oder in ihrer Nähe gestartet und endet - wenn sie keine fixe Länge hat - irgendwo 3'-wärts. Die Traktlängen würden dann eine Häufigkeitsverteilung aufweisen. Experimentell ließe sich diese Häufigkeitsverteilung durch Doppelmarker-Experimente mit unterschiedlichen Distanzen zwischen den Fehlpaarungen zeigen: mit zunehmender Distanz würde die beobachtete Entkopplung größer und steigt sprunghaft an, wenn die Distanz zwischen den Fehlpaarungen die maximale Traktlänge überschritten hat, weil dann jedes Reparaturereignis zu Markerentkopplung führt.

Zweitens: Die Nukleotidexcision hat eine fixe Länge, ähnlich wie sie auch für andere *short patch*-Reparatursysteme beschrieben wurden (siehe dazu FRIEDBERG, 1985). Durch einen noch unverstandenen Umstand kommt es mit einer gewissen Häufigkeit zu *long patch*-Reparatur, wie sie zum Beispiel für die methylierungsinstruierte Reparatur typisch ist. In diesem Falle würde in einem Doppelmarker-Experiment mit unterschiedlichen Distanzen zwischen den Fehlpaarungen der Anteil an entkoppelter Reparatur konstant bleiben.

Um zwischen beiden Hypothesen entscheiden zu können, wurden eine Serie von Doppelmarker-Experimenten durchgeführt. Die dafür benötigten Mutanten wurden durch gezielte Mutagenese konstruiert (zu den Mutationen siehe Figur 8): als *repair prone*-Fehlpaarung diente einmal die T/G-Fehlpaarung in Codon 4.3; die nicht-reparierbare Fehlpaarung war entweder 31 Nukleotide (Codon 6) oder 46 Nukleotide (Codon 11), 63 Nukleotide (Codon 17) oder 132 Nukleotide (Codon 40) in promotordistaler Richtung im *lacZ*-Gen entfernt; zum anderen war die G/T-Fehlpaarung in Codon 16 reparaturauslösend, mit nicht-reparierbaren Fehlpaarungen in den Codons 11 bzw. 6 (15 bzw. 31 Nukleotide in promotorproximaler Richtung im *lacZ*-Gen).

Tabelle 12: Markerentkopplungsexperimente mit Heteroduplex-DNAs, die zwei Fehlpaarungen enthalten

relevanter Genotyp des Transfektions- wirtes	Zustand der Adenin- methylierung	Ausbeute an Phagen mit farbigem Plaquephänotyp		Ausbeute an Phagen mit farbigem Plaquephänotyp	
		WK-6-Stämme		BMH 71-18-Stämme	
		(+)Strang (-)Strang	nach Transfektion	nach Reinfektion	nach Transfektion
<i>mutH</i>	me+/me+	26 % (3/4)	15 % (3/4)	46 % (2/4)	16 % (2/1)
	me-/me+	23 % (2/1)	14 % (2/2)	45 % (3/0)	17 % (4/4)
	me+/me-	24 % (2/1)	18 % (2/1)	47 % (3/2)	17 % (4/2)
	me-/me-	23 % (2/0)	15 % (2/3)	45 % (4/3)	17 % (4/4)
Wildtyp	me+/me+	19 % (3/2)	6 % (3/5)	32 % (3/6)	12 % (3/6)
	me-/me+	9 % (2/0)	7 % (2/2)	21 % (2/2)	12 % (2/1)
	me+/me-	13 % (2/0)	14 % (2/2)	48 % (2/1)	43 % (2/2)
	me-/me-	13 % (2/1)	12 % (2/1)	37 % (2/2)	26 % (2/4)
<i>mutS</i>	me+/me+	8 % (2/1)	2 % (2/1)	62 % (2/1)	30 % (2/1)
	me-/me+	8 % (2/0)	3 % (2/1)	64 % (2/1)	30 % (2/1)
	me+/me-	8 % (2/0)	3 % (2/1)	63 % (2/0)	28 % (2/1)
	me-/me-	8 % (2/1)	4 % (2/1)	64 % (2/2)	32 % (2/3)
<i>mutL</i>	me+/me+	6 % (2/2)	3 % (2/2)	58 % (2/7)	31 % (2/2)
	me-/me+	6 % (2/1)	3 % (2/0)	64 % (1/-)	32 % (1/-)
	me+/me-	5 % (2/0)	3 % (2/1)	60 % (1/-)	32 % (1/-)
	me-/me-	6 % (2/1)	3 % (2/2)	59 % (2/1)	32 % (2/0)
<i>dcm-6</i>	me+/me+	-	3 % (2/1)	-	9 % (2/2)
	me-/me+	-	1 % (2/0)	-	6 % (2/1)
	me+/me-	-	2 % (2/1)	-	65 % (2/2)
	me-/me-	-	2 % (2/0)	-	45 % (2/0)

Die Durchschnittswerte wurden ermittelt und dargestellt wie in der Legende zu Tabelle 5 angegeben. Die verwendeten Heteroduplex-DNA-Moleküle sind in Figur 7 dargestellt und wurden aus linearisierter RF-DNA von M13mp9revam4.3 und dem Einzelstrang von M13mp9revGln4.3op11 hergestellt. Der (-)-Strang-kodierte Plaquephänotyp ist farblos; der (+)Strang-kodierte Plaquephänotyp läßt sich bei Verwendung von BMH 71-18 als Plattierkultur supprimieren. Als Transfektionswirte wurden die Wildtypstämme und *mut*-Derivate von WK-6 und BMH 71-18 und der *dcm-6*-Stamm RHZ 2-2 verwendet.

Figur 8 (nächste Seite): Mutationen in der N-terminalen Region des *lacZ*-Genfragmentes verschiedener M13mp9rev-Phagen zur Untersuchung von DNA-Reparatur-Traktlängen. Zur Codon-Nummerierung siehe Legende zu Figur 3. Die Konstruktion der Mutationen ist im Abschnitt "Experimenteller Teil" beschrieben.

	1	2	3	4	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6	4.7	4.8	4.9	4.10
	Thr	Met	Ile	Thr	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Gly	Arg	Arg	Ile	Pro
5'-	ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	CCA	AGC	TTG	GCT	GCA	GGT	CGA	CGG	ATC
3'-	TAC	TGG	TAC	TAA	TGC	GGT	TCG	AAC	CGA	CGT	CCA	GCT	GCC	TAG

↓
am4.3: TAG
 ATC

↙ ↘
Gln4.3: CAG Ser4.3: TCG
 GTC AGC

	4.11	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	Gly	Asn	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Leu	Gln	Arg	Arg	Asp	Trp	Glu	Asn
GGG	AAT	TCA	CTG	GCC	GTC	GTT	TTA	CAA	CGT	CGT	GAC	TGG	GAA	AAC	
CCC	TTA	AGT	GAC	CGG	CAG	CAA	AAT	GTT	GCA	GCA	CTG	ACC	CTT	TTG	

↓
oc6: TAA
 ATT

↓
op11: TGA
 ACT

↓
Ala15: GCC TGG
 CGG ACC

↓
Ala15am16: GCC TAG
 CGG ATC

↓
oc17: TAA
 ATT

	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
	Pro	Gly	Val	Thr	Gln	Leu	Asn	Arg	Leu	Ala	Ala	His	Pro	Pro	Phe
CCT	GGC	GTT	ACC	CAA	CTT	AAT	CGC	CTT	GCA	GCA	CAT	CCC	CCT	TTC	
GGA	CCG	CAA	TGG	GTT	GAA	TTA	GCG	GAA	CGT	CGT	GTA	GGG	GGA	AAG	

	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47
	Ala	Ser	Trp	Arg	Asn	Ser	Glu	Glu	Ala	Arg	Thr	Asp	Arg	Pro
GCC	AGC	TGG	CGT	AAT	AGC	GAA	GAG	GCC	CGC	ACC	GAT	CGC	CCT-3'	
CGG	TCG	ACC	GCA	TTA	TCG	CTT	CTC	CGG	GCG	TGG	CTA	GCG	GGA-5'	

↓
oc40: TAA
 ATT

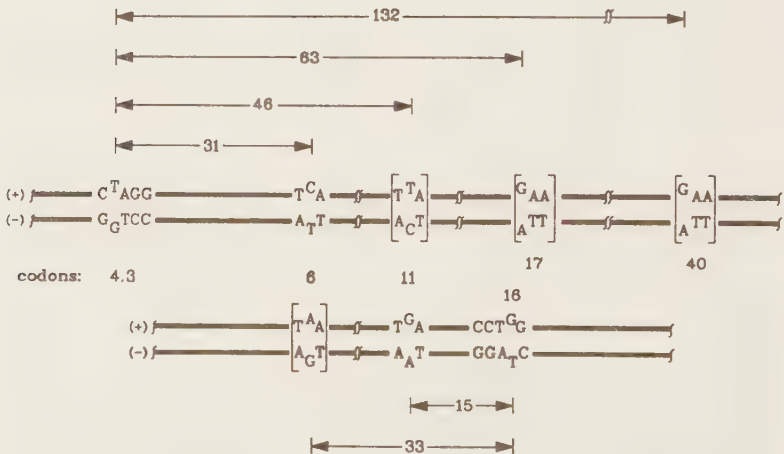
↓
ATR: AGT GAA GAA
 TCA CTT CTT

↓
oc40ATR: AGT TAA GAA
 TCA ATT CTT

Die Heteroduplex-DNA-Moleküle waren vollmethyliert und wurden hergestellt aus Einzelstrang-DNA von M13mp9revam4.3, die gegen die linearisierte RF-DNA von M13mp9revGln4.3oc6, M13mp9revGln4.3op11, M13mp9revGln4.3oc17 oder M13mp9revGln4.3oc40ATR hybridisiert war (ndDNAs 1 - 4 in Tabelle 13). [Die Verwendung von M13mp9revGln4.3oc40ATR (ATR steht für A/T-reiche Sequenzumgebung um Codon 40) wurde notwendig, weil sich die G/A-Fehlpaarung in Codon 40 mit der umgebenden Wildtyp-Sequenz als gut reparierbar erwies. In A/T-reicher Sequenzumgebung war dieselbe Fehlpaarung deutlich schlechter reparierbar. Die Korrelation von schlechter Reparierbarkeit von Fehlpaarungen und A/T-reicher Sequenzumgebung wurde schon von JONES *et al.*, 1987 b, beschrieben.]

Zwei weitere Heteroduplex-DNAs (die ndDNAs 5 und 6) wurden durch Hybridisierung von ssDNA von M13mp9revoc6Ala15 oder M13mp9revop11Ala15 gegen linearisierte RF-DNA von M13mp9revAla15am16 konstruiert.

In Figur 9 sind die Heteroduplex-DNAs schematisch dargestellt. Das Ergebnis der Transfektionsexperimente ist in Tabelle 13 zusammengefaßt.



Figur 9: Schematische Darstellung der sechs Heteroduplex-DNAs mit zwei definierten Fehlpaarungen, die zur Untersuchung der Traktlänge der VSP-Reparatur eingesetzt wurden.

Dargestellt sind die *dcm*-Erkennungssequenzen mit den T/G (G/T)-Fehlpaarungen in den Codons 4.3 und 16 und die Fehlpaarungen in den Codons 6, 11, 17 und 40. Die Distanzen zwischen den Fehlpaarungen sind durch entsprechende Pfeile angegeben. Für die oberen Heteroduplex-DNAs wurde der (+)Strang des Phagen M13mp9revam4.3 mit dem (-)Strang von Doppelmutanten hybridisiert, die neben dem Gln4.3-Codon noch ein Stop-Codon in 6, 11, 17 oder 40 haben. Für die unteren Heteroduplex-DNAs wurde der (-)Strang des M13mp9revAla15am16-Genoms an den (+)Strang der Doppelmutanten M13mp9revoc6Ala15 und M13mp9revop11Ala15 hybridisiert.

Im *mutH*-Hintergrund, wo der Einfluß konkurrierender Reparatursysteme klein ist, ist keine Zunahme der entkoppelten Reparatur bei Vergrößerung der Distanz zwischen den Fehlpaarungen zu beobachten. Stattdessen schwankt der Anteil entkoppelter Reparatur um einen Mittelwert von 27 % für Experimente mit WK-6*mutH* und etwa 36 % für Experimente mit BMH 71-18*mutH*. Die größten in der Literatur beschriebenen Reparatur-Traktlängen von *short patch*-Reparatur werden mit 100 - 120 Nukleotiden angegeben (siehe z. B. COOPER, 1982; MATSON and BAMBARA, 1981). Aber selbst bei einer Distanz von 132 Nukleotiden findet keine sprunghafte Zunahme von entkoppelter Reparatur statt. Man muß daher annehmen, daß es sich bei den großen Traktlängen tatsächlich um *long patch*-Reparatur handelt.

Im *mutS*-, *mutL*- und *dcm-6*-Hintergrund geht die entkoppelte Reparatur stark zurück, ist aber noch signifikant vorhanden. Dies wird durch Vergleich mit dem Δ *dcm*-Stamm RP4182 deutlich, in dem keine entkoppelte Reparatur nachweisbar ist. Hier zeigt sich sehr viel deutlicher der in Abschnitt 3.5. beschriebene Alleleffekt.

3.6.4. Nachweis großer Traktlängen, die durch das VSP-Reparatursystem initiiert werden

Die im vorigen Abschnitt beschriebenen ndDNAs 5 und 6 sind dazu geeignet, die VSP-initiierte *long patch*-Reparatur eindeutig nachzuweisen.

Wie in Abschnitt 3.4. beschrieben führt die *nick*-instruierte *mismatch*-Reparatur von ndDNAs zu einer leichten Bevorzugung des (-)Strangs und liefert (-)Strangmarkerausbeute von ca. 74 % (gezeigt am Beispiel der T/G-Fehlpaarung in Codon 23; siehe Tabelle 7). Auch das VSP-System benutzt bei der Korrektur der T/G-Fehlpaarung in Codon 4.3 den (-)Strang als Matrize für die DNA-Synthese, sodaß sich VSP-Reparatur mit großen Traktlängen nur indirekt zeigen läßt (siehe Abschnitt 3.6.2.). Durch Umkehrung der DNA-Strangpräferenz bei der VSP-Reparatur (wie z. B. bei der G/T-Fehlpaarung in Codon 16) läßt sich die beobachtete *long patch*-Reparatur eindeutig der VSP-Reparatur oder der *nick*-instruierten Reparatur zuordnen.

Zunächst wurde gezeigt, daß vollmethylierte Heteroduplex-DNAs mit Doppelfehlpaarungen ebenfalls mit einer 74 %-Strangpräferenz korrigiert werden; das war bisher nur an ndDNAs mit Einzelfehlpaarungen gezeigt worden. Nachgewiesen wurde dies durch Sequenzierung von 20 Klonen, die aus der Transfektion von RP4182 mit der ndDNA 5 [G/A(11)-G/T(16)-Doppelfehlpaarung; siehe Tabelle 13 und Figur 9 unten] und Reinfektion von BMH 71-18 erhalten wurden. RP4182 ist defizient für die VSP-Reparatur und profizient für methylierungsabhängige und *nick*-instruierte *mismatch*-Reparatur (siehe Tabelle 8), sodaß der farblose Plaquephänotyp, den die Nachkommen der vollmethylierten ndDNAs im Reinfektionsschritt zeigen

Tabelle 13: Markerentkopplungsexperimente zur Untersuchung der DNA-Synthesetraktlänge der VSP-Reparatur

Ausbeute an Phagen mit farbigem Plaquephänotyp											
Distanz	<i>mutH</i>		<i>mutS</i>		<i>mutL</i>		<i>dcm-6</i>		Δdcm		
	nach Transfektion	nach Reinfektion	nach Transfektion	nach Reinfektion	nach Transfektion	nach Reinfektion	nach Reinfektion	nach Reinfektion	nach Reinfektion		
1 31 bp	31 % (3/6)	15 % (3/2)	8 % (1/-)	2 % (1/-)	7 % (1/-)	1 % (1/0)	4 % (1/-)	<1 % (2/0)			
2 46 bp	25 % (3/1)	9 % (3/1)	7 % (1/-)	2 % (1/-)	8 % (1/-)	3 % (1/-)	3 % (1/-)	<1 % (2/0)			
3 63 bp	30 % (3/4)	16 % (3/3)	8 % (1/0)	4 % (1/-)	7 % (1/-)	3 % (1/-)	4 % (1/-)	<1 % (2/0)			
4 132 bp	23 % (2/1)	10 % (2/1)	9 % (2/2)	5 % (2/1)	7 % (2/1)	3 % (2/1)	3 % (2/1)	1 % (2/0)			
5 15 bp	35 % (4/5)	28 % (4/6)	11 % (4/1)	4 % (4/1)	10 % (3/2)	3 % (3/1)	7 % (2/2)	<1 % (3/0)			
6 33 bp	36 % (4/4)	30 % (4/6)	17 % (4/1)	8 % (4/2)	15 % (3/2)	5 % (3/2)	6 % (2/2)	<1 % (3/0)			

Die Durchschnittswerte wurden ermittelt und dargestellt wie in der Legende zu Tabelle 5 angegeben. Die Heteroduplex-DNAs sind schematisch in Figur 9 dargestellt. Für die ndDNAs 1 bis 4 wurden die *mut*-Derivate von WK-6 sowie RHZ 1-2 und RP4182 als Transfektionswirte benutzt. Die ndDNAs 5 und 6 wurden zur Transfektion von BMH 71-18*mut*-Derivaten, RHZ 1-2 und RP4182 eingesetzt.

(siehe Tabelle 13), das Resultat der *nick*-instruierten *long patch*-Reparatur ist. Von den 20 zufällig gepickten Klonen hatten 12 (60 %) den (-)Strang-Genotyp M13mp9revAla15am16, die restlichen 8 Klone hatten den (+)Strang-Genotyp M13mp9revop11Ala15 (Sequenzdaten nicht gezeigt). Die Abweichung von 14 % ist bei der kleinen Stichprobengröße nicht signifikant [unabhängig davon wurde die 74 %-Strangpräferenz des (-)Strangs auch an Heteroduplex-DNAs mit 5meC/A-G/A- und 5meC/A-T/C-Doppelfehlpaarungen gezeigt; siehe Abschnitt 3.7.]. In analoger Weise wurden dann die DNAs von 19 Klonen mit farblosem Plaquephänotyp sequenziert, die aus der Transfektion des VSP-Reparatur-profizienten BMH 71-18*mutH* mit derselben ndDNA erhalten wurden. 18 der 19 Klone (>90 %) besaßen den (+)Strang-Genotyp (Sequenzdaten nicht gezeigt). Bedenkt man, daß die rekombinanten Phagen (28 % blaue Plaques nach Reinfektion; siehe Tabelle 13), die bei entkoppelter Reparatur entstehen, ebenfalls Nachkommen des (+)Strangs sind, so hat sich hier die 74 %-Präferenz zugunsten des (-)Strangs der Heteroduplex-DNA in ein 95 %-*bias* zugunsten des (+)Strangs gewandelt. Diese Bevorzugung des DNA-Strangs mit der intakten *dcm*-Sequenz wurde schon in den Abschnitten 3.3. und 3.6.3. beschrieben und kann nur durch VSP-Reparatur mit großen Traktlängen erklärt werden.

Die Versuche zur Traktlängenverteilung haben zwei wichtige Erkenntnisse gebracht: 1) Es gibt nur zwei Arten von Traktlängen: sehr kurze Traktlängen von weniger als 15 Nukleotide (möglicherweise wird nur ein einziges Nukleotid korrigiert), oder lange Reparaturtrakte von über 135 Nukleotiden, die möglicherweise die für die methylierungsinstruierte oder *nick*-instruierte Reparatur typischen 3000 Nukleotide erreichen. 2) Daraus folgt ein wichtiger Hinweis auf den Mechanismus der VSP-*mismatch*-Reparatur: Die Entscheidungen zur DNA-Matrizen-Strangwahl und zur Traktlänge erfolgen getrennt und zeitlich nacheinander. Damit ist prinzipiell eine experimentelle Beeinflussung möglich. Lange Reparaturtrakte wurden von den Arbeitsgruppen Lieb und Radman im λ -System nicht nachgewiesen, es gibt jedoch Indizien aus Experimenten von RAPOSA and Fox, 1987, daß auch bei der Reparatur von λ -Heteroduplex-DNA-Molekülen große Traktlängen vorkommen. Ob das Phänomen der langen Reparaturtrakte damit Replikon-spezifisch oder Stamm-spezifisch ist, wie es der Vergleich von WK-6- und BMH 71-18-Stämmen vermuten läßt (siehe Tabelle 12), kann zur Zeit nicht entschieden werden. Darüberhinaus ergeben sich Zweifel an der Unabhängigkeit der VSP-Reparatur von der Helicase II (*uvrD*-, *mutU*-Genprodukt; siehe JONES *et al.*, 1987 a, c). *Long patch*-Reparatur, wie sie bei der methylierungsinstruierten Reparatur typisch ist, benötigt funktionelle Helicase II; dies könnte auch für VSP-initiierte Reparatur mit großen Traktlängen zutreffen und soll in zukünftigen Experimenten getestet werden.

3.7. Untersuchungen zur Substratspezifität der VSP-Reparatur

Für die von LIEB, 1983, postulierte spezifische Korrektur von T/G-Fehlpaarungen, die als Produkt hydrolytischer Desaminierungsreaktionen von 5-Methyl-Cytosinresten in der DNA spontan in der Zelle auftreten, genügt es, wenn das VSP-System das fehlgepaarte Pyrimidin innerhalb der minimalen Konsensussequenz (CAGG, CCAG) zu erkennen vermag. Da bei den von M. Lieb beschriebenen Phagenkreuzungen innerhalb einer *dcm*-Sequenz sowohl eine T/G- als auch eine 5meC/A-Fehlpaarung entstehen kann, ergibt sich die Frage, ob auch 5-meC/A-Fehlpaarungen durch das VSP-System *so* repariert werden, daß die *dcm*-Erkennungssequenz wiederhergestellt wird. Der oben beschriebene, sehr einfache Mechanismus reicht dafür nicht aus. Diese Frage ist von Bedeutung, da solche Fehlpaarungen außer bei der relativ seltenen Rekombination sehr viel häufiger bei der Replikation infolge von Fehlinkorporationen entstehen können. M. Lieb vermutete gar keine oder nur eine schlechte Reparatur dieser Fehlpaarungen, weil sie in ihren Kreuzungsexperimenten eine deutliche Asymmetrie in der Frequenz überschüssiger Rekombinanten bei Kreuzungen mit *c/*am6 beobachtet hatte. Unter der Voraussetzung, daß die "*branch migration*" bei der Rec-abhängigen Rekombination von 3'→5' verläuft (WHITE and Fox, 1974), schloß sie auf präferentielle Reparatur der T/G-Fehlpaarung. Da sie dennoch einen kleinen Anteil überschüssiger Rekombinanten beobachtete (1,4 % für Kreuzungen mit postulierter 5meC/A-Fehlpaarung gegen 4 % für Kreuzungen mit postulierter T/G-Fehlpaarung), konnte sie die Reparatur der 5meC/A-Fehlpaarung nicht völlig ausschließen (LIEB, 1983).

Zur Untersuchung dieser Frage wurden drei Heteroduplex-DNAs mit Einzel- und Doppelfehlpaarungen verwendet, die aus den reziproken DNA-Strängen der in den Abschnitten 3.2. und 3.6. beschriebenen ndDNAs hergestellt wurden: für eine ndDNA mit 5meC/A-Fehlpaarung in Codon 4.3 wurde linearisierte RF-DNA von M13mp9revam4.3 an ssDNA von M13mp9revGln4.3 hybridisiert; eine ndDNA mit 5meC/A-G/A-Doppelfehlpaarung (in den Codons 4.3 und 11) wurde aus dem linearen Genom von M13mp9revam4.3 und der Einzelstrang-DNA von M13mp9revGln4.3op11 hergestellt; eine ndDNA mit A/5meC-Fehlpaarung in Codon 16 wurde aus dem (+)Strang von M13mp9revAla15am16 und dem (-)Strang von M13mp9revAla15 konstruiert (siehe die Figuren 8, 10 und 11 oben). Diese Heteroduplex-DNAs wurden zur Transfektion von Wildtyp-, *mutH*, *S*, *L*- und *dcm*-Stämmen eingesetzt; das Ergebnis ist in den Tabellen 14, 15 und 16 dargestellt.

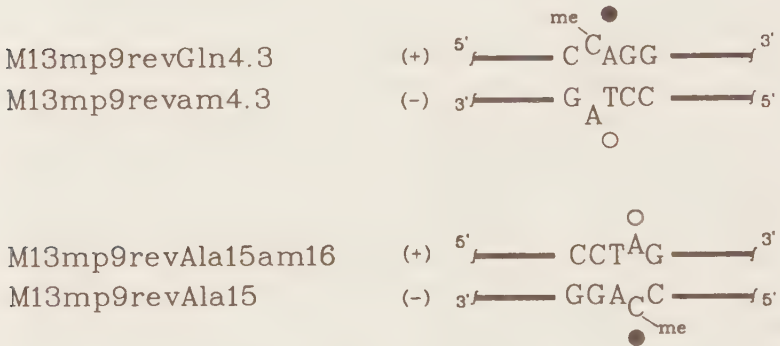
Tabelle 14 zeigt deutlich, daß bei den ndDNAs mit 5meC/A-G/A-Doppelfehlpaarung keine entkoppelte Reparatur stattfindet, die die *dcm*-Sequenz wiederherstellen würde. Die Experimente mit den BMH 71-18-Stämmen (rechter Teil der Tabelle 14) reflektieren die methylierungsabhängige Reparatur der Fehlpaarung in

Tabelle 14: Doppelmarkerexperimente zur Untersuchung der Reparierbarkeit von 5meC/A-Fehlpaarungen durch das VSP-System

relevanter Genotyp des Transfektions- wirtes	Zustand der Adenin- methylierung	Ausbeute an Phagen mit farbigem Plauephänotyp			
		WK-6-Stämme		BMH 71-18-Stämme	
		(+)Strang/ (-)Strang	nach Transfektion	nach Reinfektion	nach Transfektion
Wildtyp	me+/me+	<1 % (2/0)	<1 % (2/0)	86 % (2/0)	80 % (2/0)
	me-/me+	<1 % (2/0)	<1 % (2/0)	91 % (2/2)	88 % (2/3)
	me+/me-	2 % (2/0)	<1 % (2/0)	50 % (2/4)	44 % (2/2)
	me-/me-	1 % (2/0)	<1 % (2/0)	57 % (2/3)	57 % (2/1)
mutH	me+/me+	<1 % (2/0)	<1 % (2/0)	84 % (3/4)	75 % (3/3)
	me-/me+	<1 % (2/0)	<1 % (2/0)	83 % (3/4)	74 % (3/3)
	me+/me-	<1 % (2/0)	<1 % (2/0)	82 % (3/3)	73 % (3/5)
	me-/me-	<1 % (2/0)	<1 % (2/0)	81 % (3/3)	73 % (3/4)
mutS	me+/me+	<1 % (2/0)	<1 % (2/0)	89 % (2/1)	70 % (2/2)
	me-/me+	<1 % (2/0)	<1 % (2/0)	89 % (2/1)	69 % (2/1)
	me+/me-	<1 % (2/0)	<1 % (2/0)	87 % (2/1)	72 % (2/1)
	me-/me-	<1 % (2/0)	<1 % (2/0)	88 % (2/1)	71 % (2/2)
mutL	me+/me+	<1 % (2/0)	<1 % (2/0)	88 % (2/1)	69 % (2/1)
	me-/me+	<1 % (2/0)	<1 % (2/0)	86 % (2/1)	68 % (2/1)
	me+/me-	<1 % (2/0)	<1 % (2/0)	87 % (2/1)	67 % (2/1)
	me-/me-	<1 % (2/0)	<1 % (2/0)	86 % (2/1)	67 % (2/1)
dcm-6	me+/me+	-	1 % (2/0)	-	92 % (2/1)
	me-/me+	-	<1 % (2/0)	-	93 % (2/1)
	me+/me-	-	2 % (2/1)	-	27 % (2/2)
	me-/me-	-	1 % (2/0)	-	53 % (2/1)

Die Durchschnittswerte wurden ermittelt und dargestellt wie in der Legende zu Tabelle 5 angegeben. Die verwendeten Heteroduplex-DNA ist in Figur 11 (oben) dargestellt und wurde aus der linearisierten RF-DNA von M13mp9revam4.3 und der Einzelstrang-DNA von M13mp9revGln4.3 konstruiert. Der (-)Strang-kodierte Plauephänotyp ist farblos, aber in BMH 71-18 suppressierbar. Als Transfektionswirte wurden die Wildtypstämme und *mut*-Derivate von WK-6 und BMH 71-18 sowie RHZ 2-2 verwendet. Zur Reinfektion dienten die Wildtypstämme.

Codon 4.3; die Fehlpaarung in Codon 11 wird passiv co-repariert. In Analogie zu den in Abschnitt 3.6.1. beschriebenen Experimenten mit der Heteroduplex-DNA der Figur 7 B ist entkoppelte Reparatur, die zu Phagen mit blauem Plaquephänotyp führt, zu einem geringen Teil nachweisbar.



Figur 10: Heteroduplex-DNA-Moleküle mit definierten 5meC/A-Fehlpaarungen in *dcm*-Erkennungssequenzen.

Die Fehlpaarungen dieser Heteroduplex-DNAs sind reziprok zu den in Figur 4 dargestellten Fehlpaarungen. Zur Codon-Nummerierung und Sequenzumgebung siehe Figur 3. Die offenen und gefüllten Kreise bezeichnen Codons, die einen farblosen oder blauen Plaquephänotyp verursachen.

Im *mutH*-Hintergrund ist sowohl für die Einzelfehlpaarung als auch für die Doppelfehlpaarung keine signifikante Erhöhung der (-)Strangmarkerausbeute zu erkennen, im *mutS*- und *mutL*-Hintergrund wird nicht repariert (Tabellen 14, 16). Im *dcm*-6-Stamm wird ähnlich repariert wie in den Wildtypstämmen. In den Wildtypstämmen ist die methylierungsabhängige Reparatur allerdings nicht sehr stark ausgeprägt; das gilt für alle drei untersuchten Heteroduplex-DNAs (Tabellen 14, 15). Zwei mögliche Erklärungen bieten sich an:

Erstens: Das VSP-System repariert die 5meC/A-Fehlpaarung, indem es analog zur Reparatur der T/G-Fehlpaarung das fehlgepaarte Pyrimidin austauscht. Dieser Prozeß würde zu einer Fehlerfixierung und damit zu einem Anstieg der (-)Strangmarkerausbeuten in Codon 4.3 führen. Außerdem würden rekombinante Phagen (M13mp9revam4.3op11) auftreten.

Zweitens: Die 5meC/A-Fehlpaarung wird vom VSP-System nicht repariert; gleichzeitig ist diese Fehlpaarung wegen der 5-Methylgruppe am Cytosinrest ein schlechtes Substrat für das methylierungsinstruierte System, sodaß die methylierungsabhängigen Strangpräferenzen abgeschwächt werden.

Zur Prüfung der ersten Hypothese wurde eine Heteroduplex-DNA aus dem

Tabelle 15: Reparierbarkeit von 5meC/A- (A/5meC)-Fehlpaarungen

A) Fehlpaarung in Codon 4.3 und 16				B) Fehlpaarung in Codon 23a			
Fehlpaarung (+)Strang/ (-)Strang	Plaque- phänotyp des (-)Strang- markers	Zustand der Adenin- methylierung	WK-6/BMH 71-18		BMH 71-18		Fehlpaarung (+)Strang/ (-)Strang
			(-)Strangmarkerausbeute		(-)Strangmarkerausbeute		
			nach Transfektion	nach Reinfektion	nach Reinfektion		
5meC/A Codon 4.3	farblos	met+/met+	86 %	(4/3)	85 %	(4/6)	C/A
		me-/me+	91 %	(8/4)	91 %	(8/3)	
		met+/me-	44 %	(7/6)	46 %	(7/12)	
		me-/me-	60 %	(8/8)	58 %	(8/7)	
A/5meC Codon 16	blau	met+/met+	78 %	(4/4)	70 %	(4/5)	
		me-/me+	88 %	(3/3)	89 %	(3/2)	
		met+/me-	60 %	(4/3)	43 %	(3/9)	
		me-/me-	73 %	(3/4)	74 %	(3/2)	

Die Durchschnittswerte wurden ermittelt und dargestellt wie in der Legende zu Tabelle 5 angegeben. Die verwendeten ndDNAs sind in Figur 10 dargestellt. Als Transfektions- und Reinfektionswirt wurden für die ndDNAs mit Fehlpaarung in Codon 4.3 WK-6 und für die ndDNAs mit Fehlpaarung in Codon 16 BMH 71-18 benutzt.

^a Daten aus KRAMER *et al.*, 1984 a

Tabelle 16: Einfluß der Loci *mutH*, *mutS*, *mutL* und *dcm* auf die Reparierbarkeit von 5meC/A- (A/5meC)-Fehlpaarungen

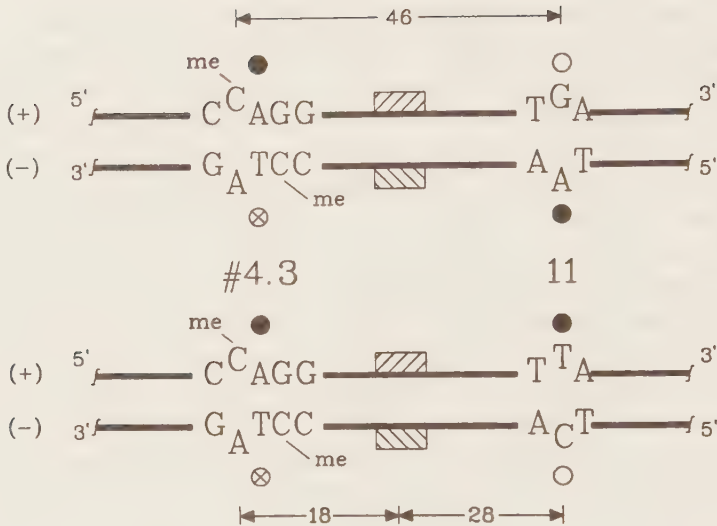
Fehlpaarung	Zustand der Adenin-methylierung	(-)Strangmarkerausbeute							
		<i>mutH</i>		<i>mutS</i>		<i>mutL</i>		Δdcm	<i>dcm-6</i>
		nach Transfektion	nach Reinfektion	nach Transfektion	nach Reinfektion	nach Transfektion	nach Reinfektion	nach Reinfektion	nach Reinfektion
5meC/A Codon 4.3	(+)Strang	71 % (4/2)	76 % (4/7)	53 % (4/4)	74 % (4/3)	52 % (3/3)	71 % (3/2)	82 % (1/-)	91 % (2/0)
	(-)Strang	72 % (3/3)	78 % (3/3)	53 % (4/6)	74 % (4/7)	53 % (3/5)	69 % (3/6)	90 % (1/-)	97 % (2/1)
	me+/me+	70 % (4/3)	76 % (4/4)	53 % (4/5)	72 % (4/2)	50 % (3/5)	72 % (3/3)	33 % (1/-)	29 % (2/2)
	me-/me-	72 % (4/3)	77 % (4/6)	55 % (4/1)	74 % (4/3)	52 % (3/3)	73 % (3/5)	56 % (1/-)	60 % (2/1)
A/5meC Codon 16	(+)Strang	85 % (2/0)	75 % (2/2)	86 % (1/-)	72 % (1/-)	85 % (1/-)	71 % (1/-)	-	72 % (3/1)
	(-)Strang	86 % (2/1)	72 % (2/1)	85 % (1/-)	71 % (1/-)	84 % (1/-)	68 % (1/-)	-	93 % (3/1)
	me+/me+	85 % (2/1)	73 % (2/1)	87 % (1/-)	73 % (1/-)	86 % (1/-)	70 % (1/-)	-	46 % (3/2)
	me-/me-	85 % (2/1)	76 % (2/1)	86 % (1/-)	71 % (1/-)	85 % (1/-)	70 % (1/-)	-	76 % (3/2)

Die Durchschnittswerte wurden ermittelt und dargestellt wie in der Legende zu Tabelle 5 angegeben. Die verwendeten ndDNAs sind in Figur 10 dargestellt. Für die ndDNAs mit der Fehlpaarung in Codon 4.3 wurden WK-6, seine *mut*-Derivate, RHZ 2-2 und RP4182 als Transfektionswirte benutzt. Für die ndDNAs mit der Fehlpaarung in Codon 16 wurden BMH 71-18 und die entsprechenden *mut*-Derivate sowie RHZ 1-2 als Transfektionswirte benutzt.

linearisierten Genom von M13mp9revam4.3op11 und der Einzelstrang-DNA von M13mp9revGln4.3 konstruiert, die zwei Fehlpaarungen hatte: eine 5meC/A-Fehlpaarung in Codon 4.3 und eine T/C-Fehlpaarung in Codon 11 (siehe Figur 11 unten). In dieser ndDNA führt Markerentkopplung durch Reparatur des (+)Strangs mit kurzen Traktlängen zu sektorierten Plaques nach der Transfektion. Diese enthalten rekombinante Phagen (vom Genotyp M13mp9revam4.3) mit farblosem, in BMH 71-18 supprimierbarem Plaquephänotyp. Reparatur des einen oder anderen DNA-Strangs mit großen Traktlängen liefert nur Phagen mit einem der beiden parental Genotypen. Replizieren sich die Heteroduplex-DNAs ohne zuvor repariert worden zu sein, erscheinen zwar auch sektorierte Plaques nach dem Transfektionsschritt, doch enthalten diese keine rekombinanten Phagen. In diesem Experiment wurde vollmethylierte ndDNA zur Transfektion von BMH 71-18*mutH* verwendet, weil im *mutH*-Hintergrund die VSP-Reparatur die größten Ausbeuten liefert. Ein Aliquot des Transfektionsansatzes wurde auf EHA-Platten plattiert und 112 Plaques durch Replattieren auf IPTG/x-Gal-Indikatorplatten mit BMH 71-18 und WK-6 als Plattierkultur analysiert: 82 Plaques (73 %) hatten einen farblosen Plaquephänotyp, 11 Plaques (10 %) hatten einen blauen Plaquephänotyp und 19 Plaques (17 %) waren sektoriert, enthielten aber keine supprimierbaren Phagen. In einem zweiten Experiment ließen sich Phagen mit supprimierbarem Plaquephänotyp in einem von 20 sektorierten Plaques nachweisen. Eine nennenswerte Fehlerfixierung durch das VSP-System konnte damit nicht gezeigt werden.

Der Nachweis von 17 % sektorierte Plaques stützt die zweite Hypothese. In früheren Experimenten wurde eine C/A-Fehlpaarung in Codon 23 von KRAMER *et al.*, 1984 a, als gut reparierbar beschrieben. Der Anteil sektoriierter Plaques wurde in dieser Studie auf kleiner als 1 % geschätzt. Der Unterschied in der Reparierbarkeit könnte auf die 5-Methylgruppe am Cytosinrest der Fehlpaarung zurückzuführen sein. Außerdem liegen die beiden untersuchten Fehlpaarungen in A/T-reicher Sequenzumgebung. Die Frage nach der unterschiedlichen Reparierbarkeit soll in zukünftigen Experimenten durch Vergleich der Reparatur von C/A- und 5meC/A-Fehlpaarungen in *dcm*-Sequenzen (z. B. in Codon 4.3) geklärt werden.

Die Experimente in diesem Abschnitt haben gezeigt, daß die 5meC/A-Fehlpaarung kein Substrat der VSP-Reparatur ist. Außerdem lieferten sie Evidenz, daß 5meC/A-Fehlpaarungen durch das methylierungsinstruierte Reparatursystem schlecht repariert werden.



Figur 11: Heteroduplex-DNA-Moleküle zum Nachweis kurzer Traktlängen bei der Reparatur von 5meC/A-Fehlpaarungen.

In beiden ndDNAs ist nur die 5meC/A-Fehlpaarung in Codon 4.3 reparaturauslösend; die Fehlpaarungen in Codon 11 sind nicht reparierbar. Die obere Heteroduplex-DNA ist reziprok zu der in Figur 7 A dargestellten ndDNA. Reparatur des (-)Strangs mit kurzen Traktlängen führt zu sektorierten Plaques, die blaue (rekombinante) Phagen enthalten. Die untere ndDNA wurde aus linearisierter RF-DNA von M13mp9revam4.3op11 hergestellt, die gegen M13mp9revGln4.3-Einzelstrang-DNA hybridisiert war. Reparatur des (+)Strangs mit kurzen Traktlängen führt zu rekombinanten Phagen mit farblosem, supprimierbarem Plaquephänotyp. Der Sequenzkontext der Fehlpaarungen ist in Figur 8 dargestellt. Zur Codon-Nummerierung siehe Legende zu Figur 3. Weitere Erklärungen sind in der Legende zu Figur 7 gegeben.

3.8. Die biologische Relevanz der VSP-Reparatur in *E. coli*

Eine eingehende Bewertung der biologischen Relevanz der VSP-Reparatur ist erst möglich, wenn die Funktion der Cytosin-Methylierung in *E. coli* und das quantitative Ausmaß der spontanen Desaminierung von 5-Methylcytosinresten in der DNA *in vivo* geklärt sind. Daher soll diese Diskussion auf Fragen zur möglichen Ursache von Transitionsmutationen in *dcm*-Sequenzen beschränkt werden. Weil VSP-Reparatur auch in *dcm*-ähnlichen Sequenzen (CAGG, CCAG) stattfindet und im Zusammenhang mit λ -Rekombination entdeckt wurde, sollen auch mögliche "Neben"-Effekte der VSP-Reparatur besprochen werden.

3.8.1. Betrachtungen zur molekularen Ursache der Transitionshotspots in dcm-Sequenzen

In einer Studie von COULONDRE *et al.*, 1978, wurden C(5meC)AGG-Sequenzen im *lacI*-Gen von *E. coli* als *hotspots* für spontane *amber*-Mutationen mit der Sequenz CTAGG beschrieben (das mutierte Nukleotid ist *kursiv* gesetzt). Die Autoren vermuteten als Ursache für dieses Phänomen, daß die hydrolytische Desaminierung von 5-Methylcytosinresten in einer nicht-reparierbaren T/G-Fehlpaarung resultiert. Unterstützt wurde ihre Hypothese durch die experimentellen Befunde, daß die beschriebenen *Transitions*hotspots in *E. coli*-B-Stämmen, die keine Cytosin-Methylierung aufweisen, und in *ung*-Stämmen, die prämutagene Cytosin-Desaminierungen nicht reparieren können, verschwanden. Die für diese Betrachtung relevanten Daten dieser Studie sind in Tabelle 17 zusammengefaßt.

Dieser Hypothese widersprechen die Ergebnisse von M. LIEB, 1983, 1985. Die hohe negative Interferenz, die sie bei Kreuzungen der λ -Phagenmutation *clam6* mit sehr eng benachbarten Mutationen in *cl*-Gen beobachtete, veranlaßte sie, ein spezifisches *mismatch*-Reparatursystem zu postulieren, daß in der Lage ist, T/G-Fehlpaarungen in *dcm*-Erkennungssequenzen zu korrigieren, die bei der Heteroduplex-DNA-Bildung während der Rekombination der λ -Phagen entstehen. Diese T/G-Fehlpaarungen entsprechen dem Produkt der hydrolytischen Desaminierungsreaktion von 5-Methylcytosinresten in *dcm*-Erkennungssequenzen.

Angesichts der experimentellen Ergebnisse M. Liebs erscheint nun die elegante Hypothese von C. Coulondre und ihren Mitarbeitern zweifelhaft, sodaß sich erneut die Frage nach der molekularen Ursache der *hotspots* in *dcm*-Sequenzen stellt.

Die ursprüngliche Hypothese der Nichtreparierbarkeit von T/G-Fehlpaarungen ist durch den direkten Nachweis des VSP-Reparatursystems (siehe Abschnitt 3.2.; ZELL and FRITZ, 1987, und JONES *et al.*, 1987 a) in Frage gestellt. Die Substratspezifität der VSP-Reparatur und die Unabhängigkeit von der *dam*-Methylierung sprechen für die vermutete Funktion, Mutationen durch Desaminierungen von 5-Methylcytosinresten in der DNA zu vermeiden. Die Vermutung, daß möglicherweise nicht alle entstehenden T/G-Fehlpaarungen durch das VSP-System korrigiert werden, sodaß die *Transitions*hotspots im *lacI*-Gen ohne die antimutagene Wirkung dieses Reparatursystems noch "heißer" wären (LIEB, 1983), kann durch folgende Überlegung ausgeschlossen werden: nicht reparierte Desaminierungen von Cytosinresten in der DNA erhöhen die spontane Mutationsfrequenz etwa um den Faktor 5 (DUNCAN *et al.*, 1978). Prinzipiell besteht für alle Cytosin- und 5-Methylcytosinreste in doppelsträngiger DNA die gleiche Wahrscheinlichkeit zu desaminieren. Die in Abschnitt 3.4. beschriebene Konkurrenz zwischen der methylierungsinstruierten Reparatur, die die spontane Mutationsfrequenz um den Faktor 100 bis 1000 absenkt,

Tabelle 17: Spontane und 2-Aminopurin-induzierte (2-AP) *amber*-Mutationen in den *dcm*-Erkennungssequenzen des *lacI*-Gens von *E. coli*

<i>dcm</i> -Sequenzen und Sequenzkontext	Mutation	Anzahl der identifizierten Mutanten ¹			
		<i>E. coli</i> K2		<i>E. coli</i> B	
		spontan (222) ⁴	2-AP (640) ⁴	spontan (63) ⁴	2-AP (99) ⁴
		<i>E. coli</i> K <i>ung</i> ³			
		spontan (54) ⁴	2-AP (99) ⁴		
		spontan (54) ⁴	2-AP (99) ⁴		
GTGAA CCAGG CCAGC	A6	51 (23 %)	270 (42 %)	4 (6 %)	39 (39 %)
GATGA CCAGG ATGCC	A15	37 (17 %)	207 (32 %)	3 (5 %)	29 (29 %)
CAGGG CCAGG CGGTG	A34	12 (5 %)	66 (10 %)	3 (5 %)	11 (11 %)

Die *dcm*-Erkennungssequenzen sind *kursiv* gesetzt; das mutierende Nukleotid ist **fett** gedruckt.

¹ Die Daten wurden aus COULONDRE *et al.*, 1978, und DUNCAN and MILLER, 1980, entnommen und dienen auch zur Berechnung der Prozentwerte

² verwendet wurde GM1 (COULONDRE *et al.*, 1978)

³ verwendet wurde BD1323 (DUNCAN and MILLER, 1980)

⁴ angegeben ist die Gesamtzahl der gefundenen *amber*-Mutanten mit *lacI*-Phänotyp

und der VSP-Reparatur, zeigt, daß trotz der konkurrierenden *mismatch*-Reparatur im Durchschnitt ca. 60 % der transfizierenden, hemimethylierten und unmethylierten Heteroduplex-DNAs und rund 90 % aller transfizierenden, vollmethylierten ndDNAs durch das VSP-System korrigiert werden. Ohne zusätzliche Annahmen (wie etwa eine *in vivo* stark erhöhte Desaminierungsrate von 5-Methylcytosin im Vergleich mit Cytosin) erscheint die Vermutung daher unwahrscheinlich, ein derart effizientes Reparatursystem sei nicht in der Lage, alle auftretenden T/G-Fehlpaarungen zu korrigieren.

Eine alternative Erklärung zur Hypothese der nicht-reparierbaren T/G-Fehlpaarungen ist, daß 5meC/A-Fehlpaarungen, die bei der Replikation entstehen, die Ursache der erhöhten Mutationsfrequenz sind. Zwei mögliche Mechanismen für diese G→A-Transitionsmutationen sind denkbar: 1) Die 5meC/A-Fehlpaarung könnte wegen der ähnlichen Stereochemie (Py/Pu-Fehlpaarung) ein Substrat der VSP-Reparatur sein. Bei Excision des Pyrimidins - analog zur Reparatur der G/T-Fehlpaarung - würde diese Reparatur zu einer Fehlerfixierung führen. 2) Die 5meC/A-Fehlpaarung ist kein Substrat der VSP-Reparatur und durch das methylierungsinstruierte Reparatursystem nur schlecht reparierbar, sodaß die prämutagene Fehlpaarung bis zur nächsten Replikation erhalten bleibt.

Die erste Hypothese läßt sich leicht ausschließen. Die in Abschnitt 3.7. beschriebenen Experimente zeigen, daß eine 5meC/A-Fehlpaarung kein Substrat der VSP-Reparatur ist. Auch eine Fehlerfixierung konnte im entsprechenden Doppelmarker-Experiment als nennenswerte Quelle für G→A-Transitionen ausgeschlossen werden.

Dagegen wird die zweite Hypothese durch eine Reihe experimenteller Evidenzen gestützt:

a) Nicht alle *dcm*-Sequenzen sind *hotspots* für Transitionsmutationen (siehe Tabelle 17). Im *lacI*-Gen fallen nur zwei *dcm*-Sequenzen durch eine erhöhte Zahl von *amber*-Mutationen auf. Etwa 1 % aller *lacI*-Mutationen sind *amber*-Mutationen, aber von 222 *amber*-Mutationen wurden 88 (= 40 %) in diesen beiden *dcm*-Sequenzen kartiert. Diese beiden Sequenzabschnitte (mit den Mutations*hotspots* A6 und A15) haben vier bzw. fünf A/T-Paare im unmittelbaren Sequenzkontext, während sich im Kontext einer dritten *dcm*-Sequenz (A34), die kein eindeutiger Transitions*hotspot* ist, nur zwei A/T-Paare befinden. Dieser Befund korreliert gut mit Ergebnissen von JONES *et al.*, 1987 b; diese Autoren haben gefunden, daß Fehlpaarungen mit A/T-reichem Sequenzkontext durch das methylierungsabhängige Reparatursystem schlechter korrigiert werden. Die beobachteten Transitionen könnten also auch durch schlechtere Reparierbarkeit von 5meC/A-Fehlpaarungen in diesen beiden Sequenzen entstanden sein. In der vierten *dcm*-Sequenz des *lacI*-Gens (Pos. 1015 - 1019), die in einem G/C-reichen Sequenzkontext liegt, würden Desaminierungen beider internen Cytosinreste

nicht durch eine Änderung der Proteinsequenz und damit als *lacI*-Mutationen in Erscheinung treten. In einer anderen Studie (SCHAAPER *et al.*, 1986), in der spontane Mutationen im *lacI*-Gen ohne Beschränkung auf *nonsense*-Mutationen untersucht wurden, fallen die vier *dcm*-Sequenzen nicht als *hotspots* auf: unter 174 *lacI*-Mutationen waren 20 Substitutionsmutationen, davon sechs *nonsense*-Mutationen und nur eine Mutation in einer *dcm*-Sequenz (A34). Eine Analyse von 95 unabhängigen, spontanen *amber*-Mutationen im *rpoB*-Gen von *E. coli* ergab keinen Hinweis auf *hotspots* in den vier *dcm*-Sequenzen dieses Gens (NENE and GLASS, 1982).

b) Ein zweites Argument spricht für die Hypothese der Purin-Fehllinkorporation: COULONDRE *et al.*, 1978, untersuchten auch Mutagen-induzierte *amber*- und *ochre*-Mutationen. DNA-modifizierende Agenzien wie Ethylmethansulfonat, Nitrosoguanidin, Nitrochinolinoxid und UV-Licht bewirkten keine erhöhten Transitionsfrequenzen in *dcm*-Sequenzen. Einzig das Basenanalogen 2-Aminopurin induzierte verstärkt solche Transitionen, die zu den Mutationen A6 und A15 führten (siehe Tabelle 17). Die *hotspots* werden sogar noch "heißer": der Anteil der Mutationen in diesen Sequenzen verdoppelt sich. Diese erhöhten Transitionsfrequenzen sind sicherlich schwer durch induzierte Desaminierung zu erklären; wahrscheinlicher ist, daß 2-Aminopurin als Basenanalogen in die DNA inkorporiert wird und die resultierende 5meC/2-AP-Fehlpaarung nicht repariert wird. Das desaminierende Agens *salpetrige Säure* wurde in dieser Studie nicht getestet; dabei hätte gerade dieses Agens die Zahl derjenigen Mutationen erhöht, die durch Desaminierung von 5-Methylcytosinresten entstehen und laut C. Coulondre und Mitarbeitern nicht repariert werden sollen, während der Hintergrund der Cytosin-Desaminierungen durch *ung*-Reparatur niedrig gehalten würde (DUNCAN *et al.*, 1978).

Die beiden Argumente, die COULONDRE *et al.*, 1978, zur Stützung ihrer Hypothese anführen, sind das Verschwinden der *hotspots* in *E. coli*-B- und in *ung*-Stämmen (siehe Tabelle 17). In beiden Fällen sind alternative Erklärungen möglich.

Den Rückgang von Transitionsmutationen im *E. coli*-B-Stamm auf die fehlende Cytosin-Methylierung zurückzuführen, ist naheliegend. Dieser Rückgang läßt sich durch die oben beschriebene schlechte Reparierbarkeit von 5meC/A-Fehlpaarungen in *E. coli*-K-Stämmen erklären: in *E. coli*-B-Stämmen, wo die Cytosin-Methylierung fehlt, können keine 5meC/A-Fehlpaarungen auftreten. Somit entfällt diese Fehlerquelle. Darüberhinaus ist nicht auszuschließen, daß in methylierten *dcm*-Sequenzen die Rate der spontanen Fehllinkorporationen erhöht ist; die Ursachen könnten eine geänderte Selektivität der DNA-Polymerase III oder eine verringerte Aktivität ihrer ϵ -Untereinheit (*proofreading*-Aktivität) sein.

In *ung*-Stämmen steigt die Zahl der Mutationen wegen der fehlenden bzw. inaktiven Uracil-DNA-Glykosylase um den Faktor 5 an (DUNCAN *et al.*, 1978). Die *dcm*-Transitions*hotspots* verschwinden daher in der allgemein erhöhten

Mutationsfrequenz (DUNCAN and MILLER, 1980; FIX and GLICKMAN, 1987). J. Miller und Mitarbeiter, interpretierten dieses Ergebnis auf der Basis nicht reparierter T/G-Fehlpaarungen, die mit derselben Häufigkeit auftreten wie nicht-reparierte U/G-Fehlpaarungen an anderen Stellen des *lacI*-Gens. In *ung*-Stämmen treten im *lacI*-Gen Mutationen mit einer Frequenz von ca. $2,5 \times 10^{-6}$ pro Zelle auf (DUNCAN and MILLER, 1980; siehe auch DUNCAN *et al.*, 1978, und SCHAAPER and DUNN, 1987). Diese Frequenz liegt in derselben Größenordnung wie spontane Replikationsfehler, die durch das DNA-mismatch-Reparatursystem schlecht korrigierbar sind. Eine alternative Erklärung zur Hypothese von J. Miller und seinen Mitarbeitern lautet: im *ung*-Stamm wird der G→A-Transitions*hotspot* in den *dcm*-Sequenzen durch den erhöhten Hintergrund von C→T-Transitionen verdeckt. 2-Aminopurin-Mutagenese erhöht die Zahl der Replikationsfehler, sodaß die schlecht reparierbaren 5meC/2-AP-Fehlpaarungen vermehrt zu den Mutationen A6 und A15 in *lacI* führen und somit wieder aus dem Hintergrund der Mutationen durch Cytosindesaminierung hervortreten können. Eine 2-Aminopurin-induzierte Desaminierung ist wenig wahrscheinlich (DUNCAN and MILLER, 1980).

3.8.2. *Frameshift-hotspots* im *lacI*-Gen und VSP-Reparatur

Eine wesentlich größere Bedeutung als die oben erwähnten Transitions*hotspots* im *lacI*-Gen spielen bestimmte, spontane *frameshift*-Mutationen. Fast 70 % aller *lacI*-Mutationen sind Deletionen oder Insertionen des Tetranukleotids 5'-CTGG-3', das repetitiv in den Positionen 620 - 631 des *lacI*-Gens angeordnet ist (FARABAUGH, 1978; FARABAUGH *et al.*, 1978; SCHAAPER *et al.*, 1986; FIX and GLICKMAN, 1987). Das Verhältnis dieser *frameshift*-Mutationen zu den übrigen Mutationen verstärkt sich signifikant in *ung*-Stämmen (FIX and GLICKMAN, 1987) und wurde auch in *dut*-Stämmen beobachtet (SEDWICK *et al.*, 1986). Andere *frameshift*-Mutationen liegen in unmittelbarer Nähe von CTGG-Sequenzen. Die Beobachtung, daß diese Mutationen in *ung*- und *dut*-Stämmen häufiger auftreten, läßt auf die Anwesenheit von Uracilresten in der DNA und die Beteiligung von DNA-Reparaturereignissen bei der Entstehung dieser Mutationen schließen. Eine mögliche Erklärung wäre, daß das VSP-System U/G-Fehlpaarungen im CTGG-Kontext als Substrat erkennt, Einzelstrangbrüche erzeugt und DNA-Reparatur einleitet, in deren Verlauf sich fehlgepaarte DNA-Abschnitte bilden, die zu Deletionen und Insertionen und damit zu *frameshift*-Mutationen führen (FIX and GLICKMAN, 1987). Sollte diese Hypothese richtig sein, dann müßte die Zahl der *frameshift*-Mutationen im Bereich der CTGG-Sequenzen in VSP-Reparatur-defizienten *ung*-Stämmen (z. B. *dcm ung*-Stämme) deutlich sinken.

3.8.3. Abschließende Betrachtungen: Die Rolle der VSP-Reparatur bei der genetischen Rekombination und Möglichkeiten zur praktischen Anwendung der VSP-Reparatur

Mismatch-Reparatur im Heteroduplex-Stadium der Rekombination wurde schon in den 60er Jahren postuliert (HOLLIDAY, 1964), aber ein Reparatursystem, daß dazu in der Lage ist, blieb zunächst unentdeckt: zahlreiche Kreuzungsexperimente mit λ -Phagen zeigten, daß die Rekombinationsfrequenz generell proportional zur Distanz zwischen den Markern ist, sodaß sich die Meinung bildete, DNA-*mismatch*-Reparatur trage nicht wesentlich zur Entstehung von Rekombinanten bei. Auch das Ende der 70er Jahre entdeckte methylierungsinstruierte Reparatursystem kommt prinzipiell dafür nicht in Frage, weil vollmethylierte DNA kein Substrat für dieses Reparatursystem ist. Allerdings läßt sich mit *in vitro*-konstruierten λ -Heteroduplex-DNA-Molekülen *mismatch*-Reparatur *in vivo* nachweisen; Grund dafür ist die *in vivo* vorkommende Hypomethylierung der λ -Phagen-DNA (WILDENBERG and MESELSON, 1975; WAGNER and MESELSON, 1976; PUKKILA *et al.*, 1983). Im Gegensatz dazu ist das VSP-Reparatursystem in der Lage, Substrat-T/G-Fehlpaarungen in vollmethylierter, rekombinierender DNA zu korrigieren. Liebs Untersuchungen zur VSP-Reparatur, Studien von RAPOSA and FOX, 1987, und MESELSON, 1987, sowie diese Arbeit zeigen, daß nicht nur T/G-Fehlpaarungen in *dcm*-Sequenzen, sondern auch in CAGG- und CCAG-Sequenzen repariert werden. Daher zeigen auch andere λ -Mutationen, die in solchen Sequenzen liegen, in Kreuzungsexperimenten hohe negative Interferenz (z. B. *cIam9*, *cIam10*, *cIam15*, *cIB36*, *Pam3*, *Pam80*; LIEB *et al.*, 1986, LIEB, 1987, WHITE and FOX, 1974). Eine weitere Eigenschaft dieses Reparatursystem besteht also darin, einen nicht reziproken Transfer genetischer Information bei der Rekombination zu ermöglichen. JONES *et al.*, 1987 c, schlagen daher für die genauere Kartierung eng benachbarter Mutationen die Verwendung VSP-defizienter *E. coli*-Stämme zur Vermeidung dieses Effekts vor.

Eine weitergehende praktische Anwendungsmöglichkeit der VSP-Reparatur ist denkbar: Die in Abschnitt 3.6.2. beschriebenen Doppelmarker-Experimente zeigen, daß es mit Hilfe geeigneter Heteroduplex-DNA-Moleküle möglich ist, unter Ausnutzung der Eigenschaften der VSP-Reparatur, rekombinante DNA zu erzeugen. Wegen der kurzen DNA-Synthesetraktlängen bei der Reparatur können die Heteroduplex-DNA-Bereiche relativ kurz sein (KOLMAR, 1987; Roland Zell, Harald Kolmar und Hans-Joachim Fritz, Daten nicht gezeigt). Damit scheint die Entwicklung einer neuen Methode der Oligonukleotid-gerichteten Mutagenese möglich.

4. Zusammenfassung

Das "very short patch"-DNA-mismatch-Reparatursystem (VSP) wurde von M. Lieb ursprünglich aufgrund seiner Eigenschaft postuliert, "überschüssige" Rekombinanten in Kreuzungen zwischen der λ cl-Mutation am6 und sehr eng benachbarten Markern zu erzeugen. Unter der Annahme von Heteroduplex-DNA-Bildung während der Rekombination entsteht bei diesen Kreuzungen eine T/G-Fehlpaarung im Kontext einer *dcm*-Erkennungssequenz. Diese Fehlpaarung entspricht formal den T/G-Fehlpaarungen, die bei der hydrolytischen Desaminierung von 5-Methylcytosinresten in der DNA entstehen. Das VSP-System wurde daher als spezifisches Korrektursystem mit kurzen Reparaturtraktlängen für solche Fehlpaarungen postuliert. Diese Entdeckung steht im Widerspruch zu der Hypothese von C. Coulondre und Mitarbeitern, daß T/G-Fehlpaarungen, die durch Desaminierung von 5-Methylcytosinresten in der DNA entstehen, nicht reparierbar und damit die Ursache für Transitions*shots* in *dcm*-Erkennungssequenzen des *lacI*-Gens sind.

Aufgabe dieser Arbeit war es, zur Klärung des oben beschriebenen Widerspruchs beizutragen. Dazu wurde folgendes experimentelles System gewählt:

Der Nachweis der VSP-Reparatur wurde erbracht, indem CaCl₂-behandelte *E. coli*-Zellen mit *in vitro* konstruierten M13-Heteroduplex-DNA-Molekülen transfiziert wurden. Die Heteroduplex-DNAs, deren intrazelluläres Schicksal sich in einem zweistufigen genetischen Assay verfolgen ließ, hatten definierte T/G-Fehlpaarungen in *dcm*-Sequenzen und kontrollierte *dam*- und *dcm*-Methylierungszustände. Sie wurden aus den Genomen aller Phagenstämme präpariert, die mit Hilfe der Oligonukleotid-dirigierten Mutagenese aus dem Phagen M13mp9rev hergestellt wurden. Es wurden zwei Fehlpaarungen im 5'-Bereich des *lacZ*- α -Genfragmentes untersucht (Codons 4.3 und 16). Zur Bestimmung der Traktlänge der DNA-Neusynthese wurden Heteroduplex-DNAs verwendet, die zwei definierte Fehlpaarungen mit unterschiedlicher Distanz zueinander hatten.

Das VSP-System wurde wie folgt charakterisiert:

1) Es korrigiert nur T/G-Fehlpaarungen mit großer Präferenz (möglicherweise völlig spezifisch) zugunsten des DNA-Stranges mit der intakten *dcm*-Sequenz; die reziproken 5meC/A-Fehlpaarungen werden vom VSP-System gar nicht und vom methylierungsinstruierten bzw. *nick*-instruierten Reparatursystem nur schlecht repariert.

2) Etwa 30 - 40 % der durch das VSP-System initiierten Reparaturereignisse haben kurze Traktlängen (weniger als 15 Nukleotide, möglicherweise nur ein Nukleotid), alle übrigen Traktlängen sind sehr groß (größer als 135 Nukleotide; möglicherweise erreichen sie die für *long patch*-Reparatur typischen 3000

Nukleotide). Diese Art der Traktlängenverteilung gibt einen Hinweis auf den bislang unbekannten Mechanismus der VSP-*mismatch*-Reparatur: Die Entscheidungen zur Wahl des Matrizen-DNA-Strangs und zur Traktlänge der DNA-Neusynthese sind zwei distinkte Vorgänge, die nacheinander erfolgen.

3) In der artifiziellen Situation der Transfektion konkurriert die VSP-Reparatur mit der methylierungsinstruierten *mismatch*-Reparatur um ihr Substrat.

4) Die Reparatur erfolgt unabhängig von der *dam*-Methylierung und vom *mutH*-Genprodukt.

5) In *mutS*- und *mutL*-Stämmen ist die VSP-Reparatur stark beeinträchtigt, aber noch signifikant vorhanden.

6) Es wurde eine direkte Beteiligung des Dcm-Proteins an der VSP-Reparatur gezeigt. Dies ist neben der Methyltransferase-Aktivität eine zweite Funktion dieses Proteins. Das Produkt des *dcm-6*-Allels hat seine nachweisbare Methyltransferase-Aktivität verloren, kann aber noch etwas VSP-Reparatur ermöglichen.

7) Variation der Cytosin-Methylierung und Änderungen der *dcm*-Erkennungssequenz können die Effizienz der Reparatur beeinflussen. Die unterschiedliche Abhängigkeit der beiden untersuchten Fehlpaarungen von diesen Faktoren könnte von der Sequenzumgebung und möglichen DNA-Strukturen abhängen.

Die Eigenschaften der VSP-Reparatur sprechen für die vermutete antimutagene Funktion und lassen die Hypothese der nicht-korrigierbaren T/G-Fehlpaarungen als Ursache der beobachteten Transitions*hotspots* in bestimmten *dcm*-Sequenzen des *lacI*-Gens eher als unwahrscheinlich erscheinen. Als Alternative wird folgender Mechanismus zur Entstehung der Transitions*hotspots* diskutiert: 5meC/A-Fehlpaarungen, die bei der Replikation gebildet werden und vom methylierungsinstruierten DNA-*mismatch*-Reparatursystem nicht korrigiert werden können. Evidenzen für diese Hypothese sind die experimentell beobachtbare schlechte Reparierbarkeit von 5meC/A-Fehlpaarungen in M13-Heteroduplex-DNA-Molekülen, die Korrelation der beiden beschriebenen *hotspots* mit dem A/T-Gehalt im unmittelbaren Sequenzkontext und das verstärkte Auftreten von Transitionsmutationen in *dcm*-Sequenzen nach Mutagenese mit dem Basenanalogue 2-Aminopurin.

Eine mögliche Beteiligung der VSP-Reparatur an der Entstehung von besonderen *frameshift*-Mutationen im CTGG-Deletions- und Insertions*hotspot* im *lacI*-Gen wird diskutiert.

5. Literaturverzeichnis

- Albertini, A. M., Hofer, M., Calos, M. P., and Miller, J. H. (1982): On the formation of spontaneous deletions: The importance of short sequence homologies in the generation of large deletions. *Cell* **29**, 319 - 328.
- Atkinson, T., and Smith, M. (1984). In "Oligonucleotide synthesis: A practical approach". Gait, M. J. (ed.), IRL Press, Oxford, pp. 35 - 81.
- Bankier, A. T., and Barrell, B. G. (1983): Shotgun DNA sequencing. In "Techniques in the life sciences", volume **B 5**, "Nucleic Acid Biochemistry". Flavell, R. A. (ed.), Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd., pp. 1 - 34.
- Barker, D., Schafer, M., and White, R. (1984): Restriction sites containing CpG show a higher frequency of polymorphism in Human DNA. *Cell* **36**, 131 - 138.
- Beaucage, S. L., and Caruthers, M. H. (1981): Deoxynucleoside phosphoramidites - a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Letters* **22**, 1859 - 1862.
- Biggin, M. D., Gibson, T. J., and Hong, G. F. (1983): Buffer gradient gels and ³⁵S label as an aid to rapid DNA sequence determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 3963 - 3965.
- Bird, A. P., Taggart, M. H., Nicholls, R. D., and Higgs, D. R. (1987): Non-methylated CpG-rich islands at the human α -globin locus: implications for evolution of the α -globin pseudogene. *The EMBO Journal* **6**, 999 - 1004.
- Brown, T. C., and Jiricny, J. (1987): A specific mismatch repair event protects mammalian cells from loss of 5-methylcytosine. *Cell* **50**, 945 - 950.
- Claverys, J.-P., and Lacks, S. A. (1986): Heteroduplex deoxyribonucleic acid base mismatch repair in bacteria. *Microbiological Reviews* **50**, 133 - 165.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., and Hsu, L. (1972): Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2110 - 2114.
- Cooper, P. K. (1982): Characterization of long patch excision repair of DNA in ultraviolet-irradiated *Escherichia coli*: An inducible function under Rec-Lex control. *Mol. Gen. Genet.* **185**, 189 - 197.

- Coulondre, C., Miller, J. H., Farabaugh, P. J., and Gilbert, W. (1978): Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature* **274**, 775 - 780.
- Doerfler, W. (1983): DNA methylation and gene activity. *Ann. Rev. Biochem.* **52**, 93 - 124.
- Dohet, C., Wagner, R., and Radman, M. (1985): Repair of defined single base-pair mismatches in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 503 - 505.
- Dohet, C., Wagner, R., and Radman, M. (1986): Methyl-directed repair of frameshift mutations in heteroduplex DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3395 - 3397.
- Duncan, B. K., Rockstroh, P. A., and Warner, H. R. (1978): *Escherichia coli* K-12 mutants deficient in uracil-DNA glycosylase. *J. Bacteriol.* **134**, 1039 - 1045.
- Duncan, B. K., and Miller, J. H. (1980): Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. *Nature* **287**, 560 - 561.
- Eadie, J. S., Conrad, M., Toorchen, D., and Topal, M. D. (1984): Mechanism of mutagenesis by O⁶-methylguanine. *Nature* **308**, 201 - 203.
- Farabaugh, P. J. (1978): Sequence of the *lacI* gene. *Nature* **274**, 765 - 769.
- Farabaugh, P. J., Schmeissner, U., Hofer, M., Miller, J. H. (1978): Genetic studies of the *lac* repressor. VII. On the molecular basis of spontaneous hotspots in the *lacI* gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **126**, 847 - 863.
- Fazakerley, G. V., Quignard, E., Woisard, A., Guschlbauer, W., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., Jones, M., and Radman, M. (1986): Structures of mismatched base pairs in DNA and their recognition by the *Escherichia coli* mismatch repair system. *The EMBO Journal* **5**, 3697 - 3703.
- Fix, D. F., and Glickman, B. W. (1987): Asymmetric cytosine deamination revealed by spontaneous mutational specificity in an Ung⁻ strain of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **209**, 78 - 82.
- Friedberg, E. C. (1985): DNA repair. Freeman and Company, New York.
- Gitschier, J., Wood, W. I., Tuddenham, E. G. D., Shuman, M. A., Goralka, T. M., Chen, E. Y., and Lawn, R. M. (1985): Detection and sequence of mutations in the factor VIII gene of haemophiliacs. *Nature* **315**, 427 - 430.
- Haas, R., and Meyer, T. F. (1986): The repertoire of silent pilus genes in *Neisseria*

gonorrhoeae: Evidence for gene conversion. *Cell* **44**, 107 - 115.

Hickson, I. D., Arthur, H. M., Bramhill, D., and Emmerson, P. T. (1983): The *E. coli* *uvrD* gene product is DNA helicase II. *Mol. Gen. Genet.* **190**, 265 - 270.

Holliday, R. (1964): Mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res.* **5**, 282 - 304.

Janion, C. (1982): Effect of bacterial host repair systems on the viability of hydroxylamine and methyl methanesulfonate treated T4 and λ -bacteriophages. *Mol. Gen. Genet.* **186**, 419 - 426.

Jones, M., Wagner, R., and Radman, M. (1987 a): Mismatch repair of deaminated 5-methyl-cytosine. *J. Mol. Biol.* **194**, 155 - 159.

Jones, M., Wagner, R., and Radman, M. (1987 b): Repair of a mismatch is influenced by the base composition of the surrounding nucleotide sequence. *Genetics* **115**, 605 - 610.

Jones, M., Wagner, R., and Radman, M. (1987 c): Mismatch repair and recombination in *E. coli*. *Cell* **50**, 621 - 626.

Kalnins, A., Otto, K., Rüther, U., and Müller-Hill, B. (1983): Sequence of the *lacZ* gene of *Escherichia coli*. *The EMBO Journal* **2**, 593 - 597.

Kohara, Y., Akiyama, K., and Isono, K. (1987): The physical map of the whole *E. coli* chromosome: Application of a new strategy for rapid analysis and sorting of a large genomic library. *Cell* **50**, 495 - 508.

Kolmar, H. (1987): Anwendung der "very short patch" DNA Mismatch Reparatur zur Oligonukleotid-dirigierten Mutagenese. Diplomarbeit, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Kourilsky, P. (1986): Molecular mechanisms for gene conversion in higher cells. *Trends in Genetics* **2**, 60 - 63.

Kornberg, A. (1980): DNA replication. Freeman, San Francisco.

Kramer, W., Schughart, K., and Fritz, H.-J. (1982): Directed mutagenesis of DNA cloned in filamentous phage: influence of hemimethylated GATC sites on marker recovery from restriction fragments. *Nucleic Acids Research* **10**, 6475 - 6485.

Kramer, B., Kramer, W., and Fritz, H.-J. (1984 a): Different base/base mismatches are

corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of *E. coli*. *Cell* **38**, 879 - 887.

Kramer, W., Drutsa, V., Jansen, H.-W., Kramer, B., Pflugfelder, M., and Fritz, H.-J. (1984 b): The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. *Nucleic Acids Research* **12**, 9441 - 9456.

Kramer, B. (1986): Untersuchungen zur DNA-Mismatch-Reparatur in *Escherichia coli*. Dissertation Universität zu Köln.

Kramer, W., and Fritz, H.-J., (1987): Oligonucleotide-Directed Construction of Mutations via Gapped Duplex DNA. In: "Methods in Enzymology, Vol. 154, Recombinant DNA Part E". Wu, R. and Grossman, L. (ed.), Academic Press, Inc., San Diego, pp. 350 - 367.

Kushner, S. R., Sherpherd, J., Edwards, B., and Maples, V. F. (1978): *uvrD*, *uvrE* and *recL* represent a single gene. In: "DNA repair mechanisms". Hanawalt, P. C., Friedberg, E. C., and Fox, C. F. (ed.) Academic Press, Inc., New York.

Längle-Rouault, F., Maenhaut-Michel, G., and Radman, M. (1987): GATC sequences, DNA nicks and the MutH function in *Escherichia coli* mismatch repair. *The EMBO Journal* **6**, 1121 - 1127.

Langley, K. E., Villarejo, M. R., Fowler, A. V., Zamenhof, P. J., and Zabin, I. (1975): Molecular basis of β -galactosidase α -complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 1254 - 1257.

Leong, P.-M., Hsia, H. C., and Miller, J. H. (1986): Analysis of spontaneous base substitutions generated in mismatch-repair-deficient strains of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **168**, 412 - 416.

Lieb, M. (1976): Mapping missense and nonsense mutations in gene *cI* of bacteriophage lambda: marker effects. *Mol. Gen. Genet.* **146**, 285 - 290.

Lieb, M. (1983): Specific mismatch correction in bacteriophage lambda crosses by very short patch repair. *Mol. Gen. Genet.* **191**, 118 - 125.

Lieb, M. (1985): Recombination in the λ -repressor gene: evidence that very short patch (VSP) mismatch correction restores a specific sequence. *Mol. Gen. Genet.* **199**, 465 - 470.

Lieb, M., Allen, E., and Read, D. (1986): Very short patch mismatch repair in phage

- lambda: repair sites and length of repair tracts. *Genetics* **114**, 1041 - 1060.
- Lieb, M. (1987): Bacterial genes *mutL*, *mutS*, and *dcm* participate in repair of mismatches at 5-methylcytosine sites. *J. Bacteriol.* **169**, 5241 - 5246.
- Lindahl, T., and Nyberg, B. (1974): Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* **13**, 3405 - 3410.
- Lu, A-L., Welsh, K., Clark, S., Su, S.-S., and Modrich, P. (1984): Repair of DNA base-pair mismatches in extracts of *Escherichia coli*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **49**, 589 - 596.
- Lyons, S. M., and Schendel, P. F. (1984): Kinetics of methylation in *E. coli* K12. *J. Bacteriol.* **159**, 421 - 423.
- Manarelli, B. M., Balganesch, T. S., Greenberg, B., Springhorn, S. S., and Lacks, S. A. (1985): Nucleotide sequence of the *Dpn* II DNA methylase gene of *Streptococcus pneumoniae* and its relationship to the *dam* gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4468 - 4472.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982): Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Marinus, M. G. (1976): Adenine methylation of Okazaki fragments in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **128**, 853 - 854.
- Marinus, M. G. (1987): DNA methylation in *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Genet.* **21**, 113 - 131.
- Matson, S. W., and Bambara, R. A. (1981): Short deoxyribonucleic acid repair patch length in *Escherichia coli* is determined by the processive mechanism of deoxyribonucleic acid polymerase I. *J. Bacteriol.* **146**, 275 - 284.
- Meselson, M. (1987): Methyl-directed repair of DNA mismatches. In "The recombination of genetic material", Low, K. B. (ed.), Academic Press, New York, in Druck.
- Messing, J., and Vieira, J. (1982): A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments. *Gene* **19**, 269 - 276.
- Miller, J. H. (1972): Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

- Modrich, P. (1987): DNA mismatch correction. *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 435 - 466.
- Nene, V., and Glass, R. E. (1982): Genetic studies on the β subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. I. The effect of known, single amino acid substitutions in an essential protein. *Mol. Gen. Genet.* **188**, 399 - 404.
- Pukkila, P. J., Peterson, J., Herman, G., Modrich, P., and Meselson, M. (1983): Effects of high levels of DNA adenine methylation on methyl-directed mismatch repair in *Escherichia coli*. *Genetics* **104**, 571 - 582.
- Radman, M., and Wagner, R. (1986): Mismatch repair in *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Genet.* **20**, 523 - 538.
- Raposa, S., and Fox, M. S. (1987): Some features of base pair mismatch and heterology repair in *Escherichia coli*. *Genetics* **117**, 381 - 390.
- Reynaud, C.-A., Dahan, A., and Weill, J.-C. (1987): A gene conversion program during the ontogenesis of chicken B cells. *Trends in Genetics* **3**, 248 - 251.
- Rydberg, B. (1977): Bromuracil mutagenesis in *Escherichia coli*: Evidence for involvement of mismatch repair. *Mol. Gen. Genet.* **152**, 19 - 28.
- Rydberg, B. (1978): Bromuracil mutagenesis and mismatch repair in mutator strains of *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* **52**, 11 - 24.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463 - 5467.
- Schaaper, R. M., Danforth, B. N., and Glickman, B. W. (1986): Mechanisms of spontaneous mutagenesis: An analysis of the spectrum of spontaneous mutation in the *Escherichia coli lacI* gene. *J. Mol. Biol.* **189**, 273 - 284.
- Schaaper, R. M., and Dunn, R. L. (1987): Spectra of spontaneous mutations in *Escherichia coli* strains defective in mismatch correction: The nature of *in vivo* DNA replication errors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6220 - 6224.
- Sedwick, W. D., Brown, O. E., Glickman, B. W. (1986): Deoxyuridine misincorporation causes site-specific mutational lesions in the *lacI* gene of *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* **162**, 7 - 20.
- Segal, E., Hagblom, P., Seifert, H. S., and So, M. (1986): Antigenic variation of gonococcal pilus involves assembly of separated silent gene segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 2177 - 2181.

- Sicard, M., Lefevre, J.-C., Mostachfi, P., Gasc, A.-M., Sarda, C. (1985): Localized conversion in *Streptococcus pneumoniae* recombination: Heteroduplex preference. *Genetics* **110**, 557 - 568.
- Sledziewska-Gojska, E., and Janion, C. (1982): Effect of proofreading and *dam*-instructed mismatch repair systems on N⁴-hydroxycytidine-induced mutagenesis. *Mol. Gen. Genet.* **186**, 411 - 418.
- Streisinger, G., Okada, Y., Emrich, J., Newton, J., Tsugita, A., Terzaghi, E., and Inouye, M. (1966): Frameshift mutations and the genetic code. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **31**, 77 - 84.
- Su, S.-S., and Modrich, P. (1986): *Escherichia coli* *mutS*-encoded protein binds to mismatched DNA base pairs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 5057 - 5061.
- Tiraby, J.-G., and Fox, M. S. (1973): Marker discrimination in transformation and mutation of pneumococcus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 3541 - 3545.
- Wagner Jr., R., and Meselson, M. (1976): Repair tracts in mismatched DNA heteroduplexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 4135 - 4139.
- Walker, J. E., and Gay, N. J. (1983): Analysis of *Escherichia coli* ATP synthase subunits by DNA and Protein sequencing. *Meth. Enzymol.* **97**, 195 - 218.
- Welsh, K. M., Lu, A.-L., Clark, S., and Modrich, P. (1987): Isolation and characterization of the *Escherichia coli* *mutH* gene product. *J. Biol. Chem.* **262**, 15624 - 15629.
- White, R. L., and Fox, M. S. (1974): On the molecular basis of high negative interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 1544 - 1548.
- Wieslander, L. (1979): A simple method to recover intact high molecular weight RNA and DNA after electrophoretic separation in low gelling temperature agarose gels. *Anal. Biochem.* **98**, 305 - 309.
- Wildenberg, J., and Meselson, M. (1975): Mismatch repair in heteroduplex DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 2202 - 2206.
- Wu, R., Wu, N.-H., Hanna, Z., Georges, F., and Narang, S. (1984). In "Oligonucleotide synthesis: A practical approach". Gait, M. J. (ed), IRL Press, Oxford, pp. 135 - 151.
- Youssofian, H., Kazazian Jr., H. H., Phillips, D. G., Aronis, S., Tsiftis, G., Brown,

V. A., and Antonarakis, S. E. (1986): Recurrent mutations in haemophilia A give evidence for CpG mutation hotspots. *Nature* **324**, 380 - 382.

Zell, R., and Fritz, H.-J. (1987): DNA mismatch-repair in *Escherichia coli* counteracting the hydrolytic deamination of 5-methyl-cytosine residues. *The EMBO Journal* **6**, 1809 - 1815.

Lebenslauf

Name: Roland Zell
Geburtstag: 17.04.1958 in Leverkusen
Familienstand: ledig
Eltern: Erwin Zell und Erika Zell, geb. Rack

besuchte Schulen:

1964 - 1967 Gemeinschaftsschule Mathildenhof in Leverkusen
1967 - 1978 Freiherr-vom-Stein-Gymnasium in Leverkusen

Bundeswehr:

1978 - 1979 Grundwehrdienst in Oldenburg/Oldbg.

Studium:

1979 - 1985 Studium der Biologie an der Universität zu Köln
1984 - 1985 Diplomarbeit bei Prof. Beyreuther (Thema: Proteinchemische Charakterisierung von Proteinen der Zell-Zell-Interaktion) am Institut für Genetik
1985 - 1988 Promotionsstudium an der Universität zu Köln und an der Ludwig-Maximilians-Universität München
seit Mai 1985 experimentelle Arbeiten zur Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried b. München, Abteilung Zellbiologie

